台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.64 No.2 2015

Review Article

81 Glycoalkaloids in Potatoes: Impact Factors and Appropriate Managements
Tsung-Yen Wu, Chen-Lun Huang, and Shwu-Jene Tsai

Research Articles

89 Effect of Temperature on Virulence of *Ralstonia solanacearum* Biovars and Response of Potato Cultivars (Lines) to Bacterial Wilt
Ming-Fu Chuang, Shu-Fung Lo, and Ching-Yi Lin

99 Breeding of White-glutinous Maize Hybrid 'Tainung No. 6'
Guang-Jauh Shieh

109 Bacterial Leaf Streak of Rice Caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Fang *et al.*) Swings *et al.* in Taiwan
Chun-Wei Chen, Shiow-Huey Hseu, Yih-Chang Chang, and Lih-Jiuan Hsieh

122 Determination of Physiological Parameters of *Phalaenopsis* Cultivars by Using Response Surface Methodology
Jian-Cheng Ciou, Ting-Fang Hsieh, Jyh-Rong Tsay, and Ting-En Dai

135 Development of Primers for Detection of Whiteflies Carrying Leaf Curl Disease: Causing Agents
Ying-Huey Cheng, Han-Chao Lin, and Feng-Chyi Lin

145 Transcriptomic Analysis of a Resistant Mutant in Response to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Infection
Chiao-Yi Huang, Szu-Yi Chou, Ya-Lin Lee, Wen-Bin Tseng, Chun-Wei Chen, Chang-Sheng Wang, and Da-Gin Lin

Short Communication

159 Preparation and Application of Polyclonal Antibody on *Lettuce mosaic virus*
Li-Yu Tsao and Jaw-Neng Lin

ISSN 0022-4847
9 770022 484003

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究 JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH Vol.64 No.2 2015

ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.64 No.2 2015

專題論述

81 馬鈴薯茄鹼：影響因子與管理措施
吳宗諺、黃哲倫、蔡淑珍

研究報告

89 溫度對青枯病菌致病力之影響與馬鈴薯品種 (系) 對青枯病反應之初步評估
莊明富、羅淑芳、林靜宜

99 白糯玉米「台農 6 號」之育成
謝光照

109 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* 引起的水稻細菌性條斑病
陳純葳、許秀惠、張義璋、謝麗娟

122 利用反應曲面法進行蝴蝶蘭種苗生理特性檢測之研究
邱健誠、謝廷芳、蔡致榮、戴廷恩

135 檢測銀葉粉蝨體內南瓜捲葉病毒 (*Squash leaf curl Philippines virus*) 專一性引子開發
鄭櫻慧、林漢釗、林鳳琪

145 水稻白葉枯病抗性突變體接種白葉枯病菌之轉錄體學研究
黃巧宜、周思儀、李雅琳、曾文彬、陳純葳、王強生、林大鈞

研究簡報

159 萵苣嵌紋病毒之多元抗血清製作與應用
曹麗玉、林照能

行政院農業委員會農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

楊純明／農業試驗所作物組

領域主編（按筆劃序）

王強生／中興大學農藝系
申　雍／中興大學土壤環境科學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
呂秀英／苗栗區農業改良場
柯文雄／中興大學植物病理學系
侯豐男／中興大學昆蟲學系
郭鴻裕／農業試驗所農業化學組
高景輝／台灣大學農藝學系
陳世銘／台灣大學生物產業機電工程系
陳吉仲／中興大學應用經濟系
陳宗禮／中興大學農藝系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
陳福旗／屏東科技大學農園生產系
黃振文／中興大學植物病理學系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／台灣大學園藝暨景觀學系
鄔宏潘／中央研究院植物暨微生物學研究所
曾夢蛟／中興大學園藝系
蔡致榮／農業試驗所
蔡新聲／朝陽科技大學生化科技研究所
歐錫坤／農業試驗所作物組
簡立賢／中興大學應用經濟系
蘇正德／東海大學食品科學系

編輯助理

李妙君／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
吳宜晏／農業試驗所技術服務組
陳相君／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

台灣農業研究

第六十四卷　第二期　　中華民國一〇四年六月三十日

出版者	行政院農業委員會農業試驗所
發行人	陳駿季
總編輯	楊純明
地址	41362 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址	http://www.tari.gov.tw
電話	(04)2331-7236
E-mail	jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統	http://aspers.airiti.com/Aspers/webHome.aspx?jnliid=J0042
編印	Airiti Press Inc.
地址	23452 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話	(02)2926-6006
E-mail	press@airiti.com
定價	新台幣一七五元
展售門市	1. 國家書店／ 10485 台北市松江路 209 號 1 樓／電話 : (02) 2518-0207 國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw 2. 五南文化廣場／ 40042 台中市中山路 6 號／電話 : (04) 2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(2):81–88 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06402.01

專題論述

馬鈴薯茄鹼：影響因子與管理措施

吳宗諺[1]　黃哲倫[2]　蔡淑珍[3,*]

摘要

吳宗諺、黃哲倫、蔡淑珍。2015。馬鈴薯茄鹼：影響因子與管理措施。台灣農業研究 64(2):81–88。

本文乃回顧馬鈴薯茄鹼資料，包括含量分布、影響因子和管控措施等，俾於符合安全食用。茄鹼係存在於茄科植物 (如馬鈴薯等) 的天然毒素，國際公認馬鈴薯茄鹼含量安全臨界值為 200 mg kg^{-1} FW，而一般則建議選育新品種在 100 mg kg^{-1} FW 之下。除了馬鈴薯薯塊中心部位外，茄鹼存在馬鈴薯植株各部位，尤其以芽、花、薯皮及芽點等代謝活力強的部位茄鹼含量高。馬鈴薯茄鹼含量多寡具有高度遺傳性，且易因照光、逆境及損傷等造成含量增高。選育低茄鹼馬鈴薯為降低馬鈴薯茄鹼含量最有效的方法，而其他因素亦影響茄鹼高低，例如成熟度、栽培管理、施肥、貯藏溫度及條件等。由於茄鹼具有熱穩定性，不易受烹煮影響，因此馬鈴薯不論在採收前後、貯藏時、貨架上、或家居貯放及準備時，均應妥適處理和管理，如此可以防範薯塊內茄鹼蓄積並控制於安全臨界值之下，避免引起人體健康危害風險。

關鍵詞：馬鈴薯、茄鹼、光、逆境、良好農業規範。

前言

茄科植物 (Solanaceae)，例如馬鈴薯和蕃茄等，各具有多種天然毒素，這些毒素通稱為茄鹼。茄鹼對茄科植物本身而言，具有防禦病蟲害之功用，但是對人體卻影響攝食安全性。馬鈴薯 (Solanum tuberosum) 為全球的重要糧食作物，也是台灣重要食物來源之一，台灣年產量約 45 Mg，年進口量則約 130 Mg。馬鈴薯提供人體重要營養成分，一般食用馬鈴薯的茄鹼含量在安全攝食範圍內，但食用多量高茄鹼馬鈴薯可能會導致急性中毒。近日國內發生國人疑似食用馬鈴薯後身體不適之案例，經調查其茄鹼含量尚在我國和國際的建議值 200 mg kg^{-1} FW 內，惟由此也發現國人對馬鈴薯茄鹼相關資訊並不清楚，因此搜集相關資料以釐清馬鈴薯茄鹼及其影響因子，期以作為國內馬鈴薯之育種目標、栽種、採收、貯藏、零售等之管理依據，以及消費者安全攝食之參考。

茄鹼 (配醣生物鹼) 特性與毒性風險

固醇類配醣生物鹼 (glycoalkaloids) 為自然存在於茄科植物的毒性物質，例如馬鈴薯、番茄、茄子、辣椒和甜椒等皆有，早期部分國外文獻以 solanine 統稱，國內則統稱茄鹼。目前超過 80 種茄鹼成分被鑑定出來 (Ginzberg *et al*. 2009)，不同茄科植物的主要茄鹼成分不同 (如表 1)，例如馬鈴薯塊 95% 為 α-solanine 和 α-chaconine，其中 α-chaconine 一般占約 60% 且毒性較強。在不同動物毒性試驗中，α-solanine 腹腔注射的 LD_{50} 小於 20 至 75 mg kg^{-1}，而口服 α-solanine 的 LD50 為 590 mg kg^{-1} 或以上；α-chaconine 腹腔注射的 LD_{50} 為 19.2–50 mg

投稿日期：2014 年 9 月 26 日；接受日期：2014 年 12 月 6 日。
* 通訊作者：sjtsai@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所農業化學組聘用助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系助理研究員。台灣 嘉義市。
[3] 農委會農業試驗所農業化學組副研究員。台灣 台中市。

表 1. 常見茄屬 (*Solanum* sp.) 農產品之主要茄鹼成分 (Barceloux 2009)。

Table 1. The main glycoalkaloids in common *Solanum* crop products (Barceloux 2009).

Plant	Scientific name	Glycoalkaloids
Potato	*Solanum tuberosum*	α-chaconine, α-solanine
Tomato	*Solanum lycopersicum*	α-tomatine, dehydrotomatine
Egg plant	*Solanum melongena*	solamargine, solasonine

kg^{-1} (JECFA 1993)。茄鹼幾乎不溶於水，分解或熔解溫度 190–285℃，因此具有熱穩定性 (Ruprich *et al*. 2009)。

聯合國糧農組織/世界衛生組織聯合食品添加物專家委員會 (The Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives; JECFA) 進行有關人體攝食風險評估時，認為因流行病學和試驗數據不足，並未訂定人體安全攝食量；且認為正常栽種下一般食用品種的馬鈴薯茄鹼含量在 20–100 mg kg^{-1} FW (fresh weight) 之間，而此含量範圍並無風險疑慮 (JECFA 1992)。同時，JECFA 雖未訂定規範但認可 200 mg kg^{-1} FW 為馬鈴薯的安全食用 (safe for consumption) 上限 (JECFA 1993)，此亦是國際普遍公認之安全臨界值。目前加拿大已將 200 mg kg^{-1} FW 訂為法定最大限量規範 (Health Canada 2014)，並納入 GAP (good agricultural practice) 規範中 (CanadaGAP 2014)，瑞典則將此訂為對進口馬鈴薯的最大限量規範 (SLVFS 1993)。

馬鈴薯薯塊茄鹼含量達 140 mg kg^{-1} FW 時會感覺出苦味，超過 220 mg kg^{-1} FW 時攝食後口腔有灼熱感 (Sinden *et al*. 1976)。人體茄鹼臨床毒性通常為急性毒，反應為灼熱、持續疼痛、頭痛、腹瀉、噁心、嘔吐、虛弱、意氣消沈和麻痺等症狀。因為茄鹼一般中毒症狀常和腸胃疾病症狀相似，因此常未能被正確診斷出來 (Smith *et al*. 1996)。人體對茄鹼中毒反應的敏感性高，但一般多為急性中毒的報告，少有亞急性或慢性中毒之研究探討。學者由中毒案例推估 1–3 mg kg^{-1} BW (body weight) 是引起人體中毒的劑量，1–5 mg kg^{-1} BW 即將造成嚴重中毒，3–6 mg kg^{-1} BW 可能致死，單次攝食量 1–3 mg kg^{-1} BW 則為關鍵效應劑量 (critical effect dose)。人體對茄鹼敏感程度因個體而異，小孩比成人反應更敏感 (JECFA 1993; Smith *et al*. 1996; Ruprich *et al*. 2009)。α-solanine 和 α-chaconine 在人體內的半衰期平均分別為 21 h 和 44 h (Mensinga *et al*. 2005)。因高量茄鹼帶有苦味而影響攝食，所以雖然有中毒案例，但較少有致死情形 (JECFA 1993)。因此，苦味與否也可以作為食用時馬鈴薯茄鹼含量是否偏高之簡易判別。

茄鹼於馬鈴薯植株

茄鹼於種子發芽時開始產生，隨著植株成長和光照而增加，至於開花期時達高峰。除了馬鈴薯薯塊 (tuber) 中心部位外，馬鈴薯植株每個部位均存在，如葉、頂芽、莖、花、塊莖、薯皮、芽點和芽；其中以代謝活力強的部位含量高，例如芽、花、薯皮和芽點等 (表 2) (Maga 1980; Cressey & Thomson 2007)。光照同時引發葉綠素和茄鹼產生，亦即薯塊變綠時茄鹼也相對提高，實際上葉綠素和茄鹼兩者的生化合成機制是獨立的，但薯塊變綠與否常做為茄鹼含量是否增高的篩別 (Woolfe 1987; Smith *et al*. 1996)。

茄鹼被認為是一種逆境代謝物或植物防禦素 (stress metabolites or phytoalexin)，具有天然禦敵作用，可以抗蟲、抗菌、抗食蟲動物等。因此光照、微生物或動物吃食、機械損傷、不當貯存等被視為逆境因子的刺激下，會引起茄鹼含量快速增加 (JECFA 1993; Smith *et al*. 1996)。雖然薯塊和葉片的茄鹼含量具有高度正相關性，但目前茄鹼於植體內的合成和控制機制仍尚未完全清楚 (Woolfe 1987)。由於不同植株部位的含量差異大，因此育種專家對如何選育薯塊具低茄鹼安全含量且葉片具有高茄鹼含量可以抗病蟲害之薯塊品種，仍極感興趣 (Ginzberg *et al*. 2009)。

表 2. 馬鈴薯植株不同部位之茄鹼含量 (摘選自 Cressey & Thomson 2007)。

Table 2. Glycoalkaloid contents of various parts of potato plant (adapted from Cressey & Thomson 2007).

Plant part	Glycoalkaloid content (mg kg^{-1} FW)
Flowers	2150–5000
Leaves	230–1450
Stems	23–33
Berries	180–1350
Roots	180–850
Bitter-tasting tuber	250–800
Normal tuber	10–150
Skin (2–3% of tuber)	300–640
Peel (10–12% of tuber)	150–1070
Flesh	12–100
Pith	Not detectable
Sprouts	2000–9970

茄鹼於馬鈴薯薯塊

茄鹼主要在薯塊 (potato tuber) 表皮和皮層的薄壁細胞內及在代謝旺盛的芽點區域合成，因此茄鹼在薯塊的分布也不均勻，主要存在薯皮 1.5 mm 間，尤其是外層的芽點處，往薯塊內部茄鹼含量遞減。薯皮茄鹼含量為薯肉的 3–10 倍，因品種而異，大部分品種茄鹼 60–80% 存在皮下，此可藉由削皮去除 (Woolfe 1987; Smith *et al*. 1996)。

馬鈴薯茄鹼生合成是高度遺傳性狀，含量高低深受品種影響，選育低茄鹼品種也是最有效的控制方法。國際認可薯塊茄鹼食用安全臨界值為 200 mg kg^{-1} FW，各國目前市售食用馬鈴薯品種的茄鹼含量大多在 100 mg kg^{-1} FW 以下，並建議馬鈴薯新育品種的薯塊茄鹼不要超過 100 mg kg^{-1} FW (Knuthsen *et al*. 2009)。部分專家則認為因茄鹼有關亞急性或慢性毒性訊息不明，而且受品種、地域、季節、栽培及逆境影響，建議可接受的安全界值應降低為 60–70 mg kg^{-1} FW (Woolfe 1987; Smith *et al*. 1996)。

馬鈴薯茄鹼含量影響因子

馬鈴薯茄鹼含量在採收前、採收時及採收後均受各種因子影響，包括品種、成熟度、田間環境、生長條件、採收時間與溫度、操作不當所造成損傷、貯藏溫度與曝光、薯塊包裝與零售環境等多項 (Maga 1980; Nema *et al*. 2008)。其中，品種、光照及機械損傷是影響馬鈴薯茄鹼含量高低的最重要因子，本文對於這些因子簡要說明於下。

品種

不同品種間含量差異大，一般食用品種在 20–100 mg kg^{-1} FW，高茄鹼品種則利用在抗病蟲害育種方面的研究。茄鹼生合成是很強的遺傳特性，同時品種也影響對逆境的反應程度，例如，對於不易因受光照刺激而生成茄鹼的品種，同樣也對低溫或損傷等逆境的反應較不敏感，而茄鹼生成相對減少 (Woolfe 1987; Griffiths *et al*. 1994, 1997; Dale *et al*. 1998)。不論灌溉與否，耐旱品種的茄鹼均較一般品種低 (Bejarano *et al*. 2000)。因此，要降低馬鈴薯茄鹼含量最有效的方法是選育低茄鹼品種。

成熟度

馬鈴薯薯塊未成熟時含量高，隨著薯塊長大而稀釋。未成熟和粒小馬鈴薯的茄鹼含量較高，因為未成熟馬鈴薯仍屬代謝活力相對強。由於茄鹼主要集中在表皮，粒小的馬鈴薯有相對高比例的薯皮而有較高含量 (Grunenfelder *et al*. 2006; Machado *et al*. 2007)。在食用加工時，小粒馬鈴薯常因粒小而不削皮就直接利用，更應小心薯表皮的高茄鹼含量。

光照

不論在田間、貯藏時或貨架販售時，馬鈴薯薯塊因照光而使茄鹼含量也增加，光照時

間和強度均會影響茄鹼含量 (Woolfe 1987)。田間薯塊生長時，塊莖如缺乏土壤覆蓋而照光，會有日燒 (sunburn) 現象而變綠，同時茄鹼含量增高而變苦味 (Pavlista 2001)。地上部氣生塊莖茄鹼甚至可為地下部塊莖的數十倍 (Percival & Dixon 1996; Karim *et al*. 1997)。一般藉由提高種植深度和改變田壟深寬度，以減少薯塊裸露土面而發生日燒變綠 (Pavek & Thornton 2009)。

不同光波長也影響茄鹼生合成，其中以紅光 (650 nm) 和藍光 (430 nm) 時含量最高，而以綠光 (510 nm) 和黃綠光 (560 nm) 最低，此茄鹼合成光波區也與葉綠素合成光波區相近 (Morris 1985)。貯架的馬鈴薯茄鹼隨著光照時間增長而向上攀升，但上升幅度因而品種和光源不同而有差異，例如日光燈 (螢光燈；fluorescent light) 或鈉燈較其他燈源更能引發茄鹼增加。因此在零售攤架時，若將一般使用的日光燈改以汞燈 (mercury light) 照明展示，可以有效改善減少茄鹼的增高 (Percival 1999)。

栽培管理

不適的栽培環境會使茄鹼含量，例如營養不均、霜寒害或不正常氣候變化等，反應程度因品種而異 (Woolfe 1987)。氮肥施用量增加時會增加茄鹼含量 (Mondy & Munshi 1990; Tajner-Czopek *et al*. 2008)，乾旱逆境處理也會造成部分品種茄鹼增加 (Bejarano *et al*. 2000)。有機栽培使茄鹼增加 (Hajslová *et al*. 2005; Wszekaki *et al*. 2005)，推測有機環境引發馬鈴薯內的天然抗禦物質產生，包括茄鹼的增加 (Friedman 2006)。栽培地區的土壤性質也會影響茄鹼，壤土 (loamy soil) 種植馬鈴薯的茄鹼含量比壤砂 (loamy sand) 栽種者為高 (Haase 2010)。延期採收會降低茄鹼含量，但主要影響在薯皮，因此削皮後薯肉茄鹼含量並沒有顯著差異 (Pęksa *et al*. 2002)。

種薯塊的栽植深度影響萌芽出土、地下走莖和薯塊發育。淺植方式 (8–10 cm) 因土壤下生長空間不足，易產出粒小和因曝露土表外而日燒變綠的薯塊，進而大幅降低可銷售產量 (marketable yield)，過深栽植則可能增加病害產生、減緩植株出土發育和降低產量。因此，依照品種或栽種季節不同，一般建議種薯塊栽植深度為 15–20 cm 的適度深植，以減少田間變綠薯塊的生成量 (Bohl & Love 2005; Pavek & Thornton 2009)。

傷害或損傷

採收時或採收後因病蟲害、操作或管理不當等所造成的任何傷害或損傷，均會引起茄鹼合成和蓄積；零售時受損的馬鈴薯一般茄鹼含量也較高。損傷所增加茄鹼的反應程度，因不同品種而差異大 (Dale *et al*. 1998)。加工去皮或切片造成的逆境反應，也會刺激茄鹼緩慢增高，因此削皮切片後應儘速利用 (Nema *et al*. 2008)。

貯藏

一般馬鈴薯採收後先於 10–15℃ 貯放約 10–14 d 進行癒傷處理 (curing)，而後依照貯藏時間、用途和品種而於不同貯藏溫度下貯藏 (holding)，建議馬鈴薯貯藏溫度：種薯 3–4℃、鮮食用薯 4–10℃、加工用薯 6–10℃以上 (例如薯條用薯 7–9℃以上、芋片用薯 10–13℃以上)，而且依品種而改變 (Pinhero *et al*. 2009; Bohl & Johnson 2010; Voss 2014)。

馬鈴薯低溫貯藏是否減少茄鹼產生，研究結果不一。有研究發現 4℃較 10℃能抑制發芽而茄鹼較低，但溫度影響因品種而異 (Haase 2010)。然而，其他研究則指出馬鈴薯貯藏於低溫下 (0–5℃)，雖然可以延長馬鈴薯品質，但因低溫逆境 (stress) 卻刺激茄鹼生成，因此反而茄鹼比貯藏溫度 7℃和 10℃者較高且更具苦味 (Griffiths *et al*. 1998)。室溫貯藏 (23℃) 者，茄鹼明顯較低溫貯藏者為高 (Rosenfeld *et al*. 1995)。

馬鈴薯貯藏溫度影響薯塊及其加工品質，馬鈴薯於 2–3℃時呼吸率最低，但貯藏溫度於 1–2℃時寒害產生，3–4℃則有低溫糖化 (low temperature sweetening) 及加工品質不良的問題，於 4–5℃以上即可開始發芽，而低光下貯藏 1–2 wk 仍可使馬鈴薯發芽變綠和茄鹼增加 (Voss 2014)。因此當一般貯藏溫度 8–10℃

時，需以抑芽劑處理，以避免發芽而茄鹼上升 (Haase 2010)。

處理與加工

因薯塊茄鹼主要集中在薯皮，因此食用前削皮可以去除大部分的茄鹼。大部分品種的薯塊茄鹼含量在 100 mg kg^{-1} FW 以下，經去皮可以減少 60–95% 的茄鹼；具苦味的馬鈴薯品種茄鹼可高達 800 mg kg^{-1} FW，茄鹼因含高含量而滲入薯肉，所以通常整個薯塊均存有茄鹼，因此去皮只能移除 30–50% (Woolfe 1987)。

由於茄鹼的水不溶和熱穩定特性，除了削皮外，一般加工方法 (如烹煮、焙烤、微波、油炸、冷凍乾燥、脫水) 對馬鈴薯茄鹼含量影響低微 (Bushway & Ponnampalam 1981)。當加熱溫度 (例如高溫油炸) 達 170℃或以上時，茄鹼開始分解而含量減低，例如 210℃油炸 10 min 可減少約 40% (Takagi *et al*. 1990)。但為了避免因高溫油炸產生致癌物質丙烯醯胺 (acrylamide)，一般油炸溫度限在 175℃之下，因此油炸馬鈴薯製品的茄鹼含量仍應加以注意 (Haase 2010)。

國外 GAP (good agricultural practice) 降低馬鈴薯茄鹼的處理方式

目前加拿大衛生部已法定馬鈴薯茄鹼之最大限量標準為 200 mg kg^{-1} FW，因此加拿大蔬果 GAP 中為減少茄鹼含量，特別針對馬鈴薯增加一些處理方式 (CanadaGAP 2014)：(1) 種薯取得：確認購買或選擇之種薯品種經過茄鹼檢測或有文件保證其茄鹼濃度在 200 mg kg^{-1} FW 以下。(2) 栽培生長：確保栽培過程種薯塊被土壤覆蓋，薯塊在地面下生長發育。(3) 分類及分級：不論在田間或包裝室，除了一般損傷和腐爛薯塊，變綠薯塊也必須分離淘汰。(4) 包裝：確保包裝袋的透明視窗朝下，以儘量減少光照。記錄包裝時藥劑使用。(5) 貯藏：儘可能貯存於暗處。(6) 關鍵管控：在生產場所或貯藏時，如果馬鈴薯暴露於光照下一段時間，都必須把任何綠色薯塊挑出移除。

如何控制或降低馬鈴薯茄鹼含量之建議

馬鈴薯茄鹼含量深受品種、光照、栽種和貯存環境之影響，因此在栽種採收前、採收和採後處理、貨架零售、和食材貯存與處理時，均應有妥適的管控措施，以避免馬鈴薯茄鹼含量增加，確保食用安全。建議管理措施綜合整理如下 (Woolfe 1987; Rosenfeld *et al*. 1995; Cantwell 1996; Pavlista 2001; Nema *et al*. 2008; CanadaGAP 2014)：

品種：建議馬鈴薯新育品種茄鹼含量在 100 mg kg^{-1} FW 以下。儘量選擇深植品種，如為淺植品種，建議種薯塊栽植至少要 15 cm 深。

栽培管理：適度深植並確保薯塊在生長過程均覆蓋在土壤下。避免過量或晚施氮肥。

採收時：薯塊成熟才採收；避免於高溫和大太陽下採收；採收後儘速移至遮陰處以減少光照；操作時避免薯塊瘀傷和擦傷；捨棄日燒和變綠的薯塊。

採收後：分類分級或其他操作時，儘量減少薯塊與光接觸時間。快速清洗薯塊，並有避免照光變綠的保護措施。薯塊貯放在暗處，溫度 7–10℃ (45–50℉)。避免使用透明塑膠或紅色包裝材質。如置於光照下，以黑色或深色紙袋或塑膠袋，或可避光的包裝材質。如須以透明塑膠袋包裝展示，減少曝光時間。用藥劑或臘處理以抑制發芽。貯放在具環控的場所，以避免變綠、發芽和茄鹼產生。置於零售架上時應不定時更換擺放，避免部分馬鈴薯長時間照光。

消費者：馬鈴薯貯存於乾涼黑暗環境，並儘早食用。變綠部位即使經黑暗貯藏而消失時，不表示茄鹼量下降。避免攝食馬鈴薯植株的芽和花，且勿食用受傷、腐壞、表皮組織變綠或發芽的馬鈴薯。削皮食用，而削皮切片後應儘速利用，避免置放過久而使茄鹼蓄積。不要生食或熟食具有苦味或引起口中灼熱感的馬鈴薯。

結語

馬鈴薯的茄鹼含量在田間、貯藏、貨架和消費者都可能受多種因子影響刺激而增加，因此要避免攝食過量茄鹼而引起急性中毒，必須從農場到餐桌 (farm to table) 的安全管理，包括選育和栽種低茄鹼含量的品種，適當的採收和貯藏管理，特別是避免光照和損傷，家居的食材管理和安全選用等，如此可以有效降低或控制馬鈴薯茄鹼含量而食用安全無虞。

引用文獻

Barceloux, D. G. 2009. Potatoes, tomatoes, and solanine toxicity (*Solanum tuberosum* L., *Solanum lycopersicum* L.). Dis. Mon. 55:391–402.

Bejarano, L., E. Mignolet, A. Devaux, N. Espinola, E. Carrasco, and Y. Larondelle. 2000. Glycoalkaloids in potato tubers: The effect of variety and drought stress on the α-solanine and α-chaconine contents of potatoes. J. Sci. Food Agric. 80:2096–2100.

Bohl, W. H. and S. B. Johnson. 2010. Commercial potato production in North America. 2nd Revision of American Potato Journal Supplement Volume 57 and USDA Handbook 267. http://potatoassociation.org/wp-content/uploads/2014/04/A_ProductionHandbook_Final_000.pdf (visit on 9/22/2014)

Bohl, W. H. and S. L. Love. 2005. Effect of planting depth and hilling practices on total, U.S. No. 1, and field greening tuber yields. Amer. J. Potato Res. 82:441–450.

Bushway, R. J. and R. Ponnampalam. 1981. α-chaconine and α-solanine content of potato products and their stability during several modes of cooking. J. Agric. Food Chem. 29:814–817.

CanadaGAP. 2014. Canada GAP Food Safety Manual for Fresh Fruits and Vegetables version 6.2. CanadaGAP program. CanAgPlus. Ottawa. 100 pp.

Cantwell, M. 1996. A review of important facts about potato glycoalkaloid. Perishables Handling Newsl. Issue 87:26–27.

Cressey, P. and B. Thomson. 2007. Scoping Risk from Natural Toxins in new Zealand Crop Plants. Institute of Environmental Science & Research Limited. Christchurch Science Centre. Christchurch. 71 pp.

Dale, M. F. B., D. W. Griffiths, and H. Bain. 1998. Effect of bruising on the total glycoalkaloid and chlorogenic acid content of potato (*Solanum tuberosum*) tubers of five cultivars. J. Sci. Food Agric. 77:499–505.

Friedman, M. 2006. Potato glycoalkaloids and metabolites: Roles in the plant and in the diet. J. Agric. Food Chem. 54:8655–8681.

Ginzberg, I., J. G. Tokuhisa, and R. E. Veilleux. 2009. Potato steroidal glycoalkaloids: Biosynthesis and genetic manipulation. Potato Res. 52:1–15.

Griffiths, D. W., H. Bain, and M. F. B. Dale. 1997. The effect of low-temperature storage on the glycoalkaloid content of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. J. Sci. Food Agric. 74:301–307.

Griffiths, D. W., H. Bain, and M. F. B. Dale. 1998. Effect of storage temperature on potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber glycoalkaloid content and the subsequent accumulation of glycoalkaloids and chlorophyll in response to light exposure. J. Agric. Food Chem. 46:5262–5268.

Griffiths, D. W., M. F. B. Dale, and H. Bain. 1994. The effect of cultivar, maturity and storage on photo-induced changes in the total glycoalkaloid and chlorophyll contents of potatoes (*Solanum tuberosum*). Plant Sci. 98:103–109.

Grunenfelder, L. A., L. O. Knowles, L. K. Hiller, and N. R. Knowles. 2006. Glycoalkaloid development during greening of fresh market potato (*Solanum tuberosum* L). J. Agric. Food Chem. 54:5847–5854.

Haase, N. U. 2010. Glycoalkaloid concentration in potato tubers related to storage and consumer offering. Potato Res. 53:297–307.

Hajslová, J., V. Schulzová, P. Slanina, K. Janné, K. E. Hellenäs, and Ch. Andersson. 2005. Quality of organically and conventionally grown potatoes: Four-year study of micronutrients, metals, secondary metabolites, enzymic browning and organoleptic properties. Food Add. Contam. 22:514–534.

Health Canada. 2014. Canadian standards (maximum levels) for various chemical contaminants in foods. Canada. http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/chem-chim/contaminants-guidelines-directives-eng.php (visit on 9/22/2014)

JECFA. 1992. Evaluation of Certain Food Additives and Naturally Occurring Toxicants. WHO Technical Report Series 828. World Health Organization. Geneva. 49 pp.

JECFA. 1993. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Naturally Occurring Toxicants. WHO Food Additive Series, No.30. World Health Organization. Geneva. 398 pp.

Karim, M. S., G. C. Percival, and G. R. Dixon. 1997. Comparative composition of aerial and subterranean potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). J. Sci. Food Agric. 75:251–257.

Knuthsen, P., U. Jensen, B. Schmidt, and I. K. Larsen. 2009. Glycoalkaloids in potatoes: Content of glycoalkaloids in potatoes for consumption. J. Food Composit. Anal. 22:577–581.

Machado, R. M. D., M. C. F. Toledo, and L. C. Garcia. 2007. Effect of light and temperature on the formation of glycoalkaloids in potato tubers. Food Control 18:503–508.

Maga, J. A. 1980. Potato glycoalkaloids. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 12:371–405.

Mensinga, T. T., A. J. A. M. Sips, C. J. M. Rompelberg, K. van Twillert, J. Meulenbelt, H. J. van den Top, and H. P. van Egmond. 2005. Potato glycoalkaloids and adverse effects in humans: An ascending dose study. Regul. Toxicol. Pharmacol. 41:66–72.

Mondy, N. I. and C. B. Munshi. 1990. Effect of nitrogen fertilization on glycoalkaloid and nitrate content of potatoes. J. Agric. Food Chem. 38:565–567.

Morris S. C. 1985. The spectral responses of chlorophyll and glycoalkaloid synthesis in potato tubers *Solanum tuberosum* cultivar sebago. Plant Sci. (shannon):105–110.

Nema, P. K., N. Ramayya, E. Duncan, and K. Niranjan. 2008. Potato glycoalkaloids: Formation and strategies for mitigation. J. Sci. Food Agric. 88:1869–1881.

Pavek, M. J. and R. E. Thornton. 2009. Planting depth influences potato plant morphology and economic value. Am. J. Pot. Res. 86:56–67.

Pavlista, A. D. 2001. Green Potatoes: The Problems and the Solution. Historical Materials from University of Nebraska-Lincoln Extension Paper 88. University of Nebraska-Lincoln. Lincoln. 3 pp.

Pęksa, A., G. Gołubowska, E. Rytel, G. Lisińska, and K. Aniołowski. 2002. Influence of harvest date on glycoalkaloids contents of three potato varieties. Food Chem. 78:313–317.

Percival, G. C. 1999. The influence of light upon glycoalkaloid and chlorophyll accumulation in potato tubers (*Solanum tuberosum* L). Plant Sci. 145:99–107

Percival, G. C. and G. R. Dixon. 1996. Glycoalkaloid concentrations in aerial tubers of potato (*Solanum tuberosum* L). J. Sci. Food Agric. 70:439–448.

Pinhero, R., R. Coffin, and R. Y. Yada. 2009. Post-harvest storage of potatoes. p.339–370. *in*: Advances in Potato Chemistry and Technology. (Singh, J. and L. Kaur, eds.) Elsevier. New York. 528 pp.

Rosenfeld, H. J., H. A. Sundell, P. Lea, and M. Ringstad. 1995. Influence of packaging materials and temperature on the glycoalkaloid content of potato tubers. Food Res. Intl. 28:481–484.

Ruprich, J., I. Rehurkova, and P. E. Boon, K. Svensson, S. Moussavian, H. van der Voet, S. Bosgra, J. D. van Klaveren, and L. Busk. 2009. Probabilistic modelling of exposure doses and implications for health risk characterization: Glycoalkaloids from potatoes. Food Chem. Toxicol. 47:2899–2905.

Sinden, S. L, K. L. Deahl, and B. B. Aulenbach. 1976. Effect of glycoalkaloids and phenolics on potato flavor. J. Food Sci. 41:520–523.

SLVFS. 1993. The National Food Administration's Regulations on Certain Foreign Substances in Food. SLVFS 1993:36. Swedish National Food Administration. Uppsala. 7 pp.

Smith, D. B., J. G. Roddick, and J. L. Jones. 1996. Potato glycoalkaloids: Some unanswered questions. Trends Food Sci. Tech. 7:126–131.

Tajner-Czopek, A., M. Jarych-Szyszka, and G. Lisińska. 2008. Changes in glycoalkaloids content of potatoes destined for consumption. Food Chem. 106:706–711.

Takagi, K., M. Toyoda, Y. Fujiymam, and Y. Saito. 1990. Effect of cooking on the contents of α-chaconine and α-solanine in potatoes. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 31:67–73. (in Japanese with English abstract)

Voss, R. E. 2014. Potato. *in*: The Commercial Storage of Fruits, and Florist and Nursery Stocks. (Gross, K. C., C. Y. Wang, and M. Saltveit, eds.) USDA Agricultural Handbook Number 66 (HB-66, a complete revision of the 1986 edition). United State Department of Agriculture. Beltsville. http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/potato.pdf (visit on 9/22/2014)

Woolfe, J. A. 1987. The Potato in the Human Diet. International Potato Center, Cambridge University Press. Cambridge. 231 pp.

Wszelaki, A. L., J. F. Delwiche, S. D. Walker, R. E. Liggett, J. C. Scheerens, and M. D. Kleinhenz. 2005. Sensory quality and mineral and glycoalkaloid concentrations in organically and conventionally grown redskin potatoes (*Solanum tuberosum*). J. Sci. Food Agric. 85:720–726.

Glycoalkaloids in Potatoes: Impact Factors and Appropriate Managements

Tsung-Yen Wu[1], Chen-Lun Huang[2], and Shwu-Jene Tsai[3,*]

Abstract

Wu, T. Y., C. L. Huang, and S. J. Tsai. 2015. Glycoalkaloids in potatoes: Impact factors and appropriate managements. J. Taiwan Agric. Res. 64(2):81–88.

This paper is to review the glycoalkaloids in potatoes and their impact factors, as well as appropriate managements for safe consumption of potato. Glycoalkaloids are toxic metabolites naturally occurred in Solanaceas plants, such as potato, and are harmful to human. The internationally recognized safety limit of total glycoalkaloids in potato tuber is 200 mg kg^{-1} FW, while it is suggested no more than 100 mg kg^{-1} FW for breeding new potato varieties. Glycoalkaloids are found in almost all parts of cultivated potato plant except the pith of tubers, and their concentrations are much greater in the areas of high metabolic activity, such as sprouts, flowers, and eyes. The level of total glycoalkaloids in potato tuber is highly hereditable, and can be easily accelerated by exposure to light, stress and damage. Breeding of low-glycoalkaloid varieties is considered the best way to reduce the glycoalkaloid content of potato tuber. Glycoalkaloid levels in potato tubers can also be affected by many factors, such as maturity, cultivation, fertilization, and storage temperatures and conditions, while they are little affected by cooking due to their heat stability. Therefore, appropriate practice and management should be adopted no matter during pre- and post-harvest, in storage, on the store shelf, or in home storage and preparation. Proper handling of potatoes can prevent accumulation of glycoalkaloids in tubers, control the level under the safety limit, and consequently avoid the risk to public health.

Key words: Potato, Glycoalkaloids, Light, Stress, Good agricultural practice.

Received: September 26, 2014; Accepted: December 6, 2014.
* Corresponding author, e-mail: sjtsai@tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Assistant Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
3 Associate Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

研究報告

溫度對青枯病菌致病力之影響與馬鈴薯品種 (系) 對青枯病反應之初步評估

莊明富[1] 羅淑芳[2] 林靜宜[3,*]

摘要

莊明富、羅淑芳、林靜宜。2015。溫度對青枯病菌致病力之影響與馬鈴薯品種 (系) 對青枯病反應之初步評估。台灣農業研究 64(2):89–98。

青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起之細菌性萎凋病為熱帶及亞熱帶地區作物關鍵病害之一。多數青枯病菌株於高溫對寄主具有病原性，部分菌株在 20℃以下則會失去其病原性。然而，分類上屬於第三生理小種、第二生化型 (R3Bv2) 的菌株於冷涼的溫度條件下仍可感染寄主植物，造成病害。本研究中調查 2013 年 11 月至 2014 年 3 月期間，台灣雲林縣及嘉義縣馬鈴薯栽培區萎凋病之發病率為 0–32%，分離其病原菌，發現皆為青枯病菌，其中 64.7% 之分離株為第二生化型之菌株，其餘為第三生化型之菌株，顯示青枯病菌第二生化型之菌株為目前危害台灣馬鈴薯之主要菌株。此外，亦於不同溫度下比較台灣常見 3 種 *R. solanacearum* 生化型菌株對茄科作物之致病力差異。結果顯示在 24℃及 28℃，3 種生化型菌株 (RS1102、RS1118 及 RS1125) 皆對試驗植物具有良好的致病力，接種後 20 d 罹病度 (disease severity) 介於 77–100%。但於 20℃時，RS1125 (第三生化型) 則對馬鈴薯失去其病原性，而 RS1118 (第二生化型) 則表現較其他兩種生化型菌株較強之毒力，接種 20 d 後馬鈴薯及番茄上之罹病度為 80–100%。青枯病為馬鈴薯生產栽培之限制因子之一，故本研究利用 10 種不同之馬鈴薯品種 (系) [P86 (「克尼伯」)、P90(「大西洋」)、P91 (「種苗 2 號」)、P92 (「吉比達」)、P95 (‘pike’)、P117 (‘Chipeta’，「聯華」)、P120 (「台農 1 號」)，P89、16-13 及 T3] 針對第二生化型之菌株進行抗病分析，以期篩選對青枯病具有抗性之品種。結果顯示，品種間表現出不同程度之耐性，但未獲得表現高抗 (無萎凋) 之抗病品種。接種 35 d 後，品種間罹病度為 10–100%，其中以 T3 品種之罹病度最低。經上述試驗結果可知，溫度為影響青枯病發病率之因素之一，台灣常見之 3 種青枯病菌生化型菌株中，則以第二生化型菌株在低溫時對馬鈴薯之危害程度為最高、威脅性最大。

關鍵詞：青枯病菌、生化型、溫度、抗感病性。

前言

馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L.，英名 potato) 為茄科茄屬 1 年生草本植物，原產於南美洲秘魯及安地斯山一帶。馬鈴薯球莖內含豐富的澱粉、蛋白質、礦物質及維生素等養分，且單位面積產量高，為多數歐美地區的主食，亦為世界重要糧食作物之一。馬鈴薯偏好冷涼且不潮濕的氣候條件，因此台灣普遍於秋、冬季栽種馬鈴薯。根據農委會 2012 年統計年報資料 (http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx) 顯示，每年栽培總面積約為 2 千多公頃，以中南部為主要栽培地區，其中以雲林縣栽培面積最大，其次分別為台中市、嘉義縣及台南市等地區。馬鈴薯依生長期長短，可分為早生及中晚生品種，薯肉則有白色

投稿日期：2014 年 8 月 14 日；接受日期：2014 年 12 月 1 日。
* 通訊作者：eris2024@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系前助理研究員。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系副研究員。台灣 嘉義市。
[3] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。

與黃色之分。目前台灣生產之馬鈴薯主要提供鮮食與加工之用，栽培品種主要有「克尼伯」(大葉種)、「種苗2號」、「五峰」等，其中以薯大、白皮白肉、薯形好且兼具鮮食、加工特性的早生種「克尼伯」栽培面積最廣。

青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 為世界最重要的植物病原菌之一，屬於格蘭氏陰性菌，寄主範圍廣泛，可危害多達 53 科 200 種以上寄主植物，主要寄主為番茄、馬鈴薯等茄科作物 (Denny 2006)。青枯病菌適合熱帶、亞熱帶及溫暖潮濕地區，感染後在罹病植株造成葉片失水、萎凋及維管束褐化等病徵，最終導致作物萎凋死亡，造成嚴重的經濟損失 (Hayward 1991; Elphinstone 2005; Denny 2006)。青枯病菌為一複合種 (species complex)，由許多不同的菌系組成，在生理特性、遺傳表現及寄主範圍等方面具有豐富的多樣性 (Hayward 2000; Genin & Boucher 2004; Fegan & Prior 2005)，目前有數個不同的系統用於定義與分類菌系間的差異。傳統分類系統利用菌株來源及寄主範圍的差異，將青枯病菌區分為 5 個生理小種 (race) (Buddenhagen *et al*. 1962; He *et al*. 1983)；或是根據菌株對碳水化合物的利用能力，區分為 6 種生化型 (biovar; bv) (Hayward 1964; Denny 2006)，然而，生理小種與生化型之間並無絕對的相關性；近來則根據 16S-23S 核醣體核酸基因間之內轉錄區 (internal transcribed spacer; ITS) 序列設計專一性引子 (Fegan & Prior 2005)，配合青枯病菌的專一性引子對 (Opina *et al*. 1997) 進行多重聚合酶連鎖反應 (multiplex PCR)，依電泳圖譜結果將 *R. solanacearum* 區分為 4 演化型 (phylotype)，此演化型分類系統與菌株的地域來源有相關性 (Fegan & Prior 2005; Prior & Fegan 2005)。

台灣氣候高溫多濕，青枯病常於夏季或高溫多濕的氣候條件下發生嚴重，在冬季則較少發生。然而，台灣馬鈴薯主要栽培區中的台中市神岡區、后里區及雲林縣斗南、虎尾地區分別於 1999 年冬天與 2006 年底至 2007 年初期間於馬鈴薯栽培田出現大面積的萎凋病徵，受害嚴重的田區其罹病率高達 90%，造成極大的經濟損失，經診斷鑑定結果顯示引起萎凋的病原菌為 *R. solanacearum* 第 3 生理小種，第 2 生化型 (R3Bv2) (Chiou 2002; Wu *et al*. 2010; Wu *et al*. 2011)，而非台灣本土普遍分布、可感染茄科等多種植物之第1生理小種 (race 1)、第 3 或第 4 生化型 (bv 3 或 bv 4) (Hsu 1991; Lin 2008)。*R. solanacearum* race 3/bv 2 的寄主範圍較第 1 生理小種窄，主要對馬鈴薯、番茄具有強病原性，且其耐寒性較第 1 生理小種強，在冷涼的氣候條件下可造成嚴重病害，此菌株所造成之馬鈴薯青枯病，又稱為褐腐病 (brown rot)，罹病之馬鈴薯植株地上部出現萎凋病徵，地下部薯塊則出現褐腐徵狀，已成為國外馬鈴薯栽培區的重要病害，並造成熱帶高地及溫帶地區馬鈴薯嚴重的經濟損失 (Ciampi & Sequeira 1980)。

溫度對青枯病菌危害寄主植物的能力具有關鍵性影響，多數的青枯病菌株於高溫環境下具有良好的致病力，部分的菌株則於低溫的條件下仍具有致病力。先前研究報告指出，在不同的溫度條件下 (16、20、24及 28℃)，將馬鈴薯植株分別接種 race 1 或 race 3 菌株，結果發現於高溫 (28℃) 下，所有的供試菌株其致病力並無差異，但於低溫環境下 (16℃)，僅有 2 株 race 3 菌株對馬鈴薯仍具有強致病力 (Ciampi & Sequeira 1980)。於番茄上分別接種 race 1 或 race 3 菌株，亦發現相似的結果，於高溫 (28℃) 環境下，race 1 與 race 3 供試菌株毒力並無顯著差異，但於 20℃環境下，race 3 菌株則對番茄有較強的毒力 (Milling *et al*. 2009)。此外，研究指出來自相同地區的 11 株青枯病菌株，在 30℃環境下對番茄或馬鈴薯皆具有良好的致病力，但於 18℃之低溫環境下，部分 race 1 的菌株不會對寄主植物造成病徵，但 race 3 菌株對寄主植物仍具致病力 (Bocsanczy *et al*. 2012)。

青枯病菌為土壤傳播性細菌，可於土壤中存活 (Denny 2006)，主要經由根部自然傷口、移植或機械性等方式造成的傷口侵入寄主植物之維管束造成系統性感染、阻塞水分輸送，最後使植物萎凋死亡 (Denny 2006)。青枯病菌亦可經由根與根之間的接觸感染鄰近植株，或藉

由受污染的水源、種苗或病土傳播 (Kelman & Sequeira 1965; McCarter & Jaworski 1968; Denny 2006)，在防治上具有相當的困難度。目前尚未有合適的化學藥劑可供使用，僅能以選擇健康種苗 (薯)、田間衛生管理、與非寄主輪作及抗病育種等方式加以管理 (Hsu 1991; Denny 2006)，其中以種植抗病品種為根本的防治方法。因此，本研究除了探討 3 種台灣常見之茄科青枯病生化型菌株在不同溫度條件下，對茄科作物 (馬鈴薯及番茄) 致病力之影響，以瞭解台灣茄科青枯病菌的發病特性，提供病害管理及防治參考，並利用農業試驗所嘉義分所收集保存的馬鈴薯品種作為材料，以人工接種方式分析其對馬鈴薯青枯病 race 3/bv 2 之抗/感病性，藉以篩選出可作為日後抗病育種之潛力品系 (種)。

材料與方法

馬鈴薯青枯病田間萎凋率調查

本研究於 2013 年 11 月至 2014 年 3 月期間，調查雲林及嘉義地區共 22 處之馬鈴薯栽培田區，每個田區隨機調查 3 點，每點調查 100 棵植株之萎凋率 (萎凋植株數/調查總株數 × 100%)，取其平均數，以計算各田區呈現萎凋病徵之萎凋率。並將自田間蒐集之萎凋馬鈴薯植株或薯塊，攜回實驗室後，以 0.5% 次氯酸鈉表面消毒 3 min，並經 3 次無菌水漂洗後置於無菌操作箱風乾，再切取病健部組織加入無菌水研磨，利用 TTC (triphenyl tetrazolium chloride) 鑑別培養基 (Kelman 1954) 進行菌株分離與純化，經 3 次單一菌落純化培養後，利用青枯病專一性引子對 (759：5’-GTCGCC-GTCAACTCACTTTCC-3’; 760：5’-GTCGC-CGTCAGCAATGCGGAATCG-3’) (Opina *et al*. 1997) 進行聚合酶連鎖反應，以鑑定馬鈴薯青枯病菌。

生化型測定

根據 Hayward (1964) 之方法，測定供試馬鈴薯青枯病菌株利用碳水化合物之能力，作為區分青枯病菌株生化型之依據。測定的碳水化合物分別為乳糖 (lactose)、麥芽糖 (maltose)、纖維雙糖 (cellobiose) 等 3 種雙醣及甘露糖 (mannitol)、山梨聚糖醇 (sorbitol)、半乳醣醇 (ducitol) 等 3 種六醣醇。

供試菌株來源及保存

本研究中使用之青枯病菌株有 RS1118 (bv 2)、RS1125 (bv 3) 及 RS1102 (bv 4)。其中 RS1118 及 RS1125 菌株係分離自嘉義市罹青枯病之馬鈴薯，RS1102 菌株則是來自嘉義市罹病番茄之分離株。上述之菌株皆利用青枯病專一性引子對 (Opina *et al*. 1997) 進行聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction; PCR) 檢測確認為青枯病菌，並根據 Hayward (1964) 的方法，測定青枯病菌菌株利用碳水化合物之能力，確認其生化型後，保存於生理食鹽水中以供日後試驗使用。

青枯病菌接種源製備

將保存於生理食鹽水中之青枯病菌利用滅菌過後的移植環畫線培養於 TTC 培養基 [1 g 酪蛋白 (casein hydrolysate)，10 g 蛋白腖 (peptone)，5 g 葡萄糖 (glucose)，20 g 瓊脂 (agar)，配製成 1 L 培養基經高溫滅菌後再加入 5 mL 之 1% TTC] (Kelman 1954)，挑取單一菌落於 YDC (Yeast extract dextrose calcium carbonate) 培養基 [10 g 酵母抽出物 (yeast extract)，20 g 葡萄糖 (dextrose)，20 g 碳酸鈣 (calcium carbonate) 及 15 g 瓊脂 (agar) 配製成 1 L 培養基] (Wilson *et al*. 1967)，經 48–72 h 增量培養後，以無菌水洗出成為細菌懸浮液。懸浮液利用光電比色計於 600 nm 波長下測定並調整其吸光值 (optical density; OD) 為 0.3，菌量濃度約為 10^8 cfu mL^{-1} 即成為接種源。

溫度對不同青枯病菌株致病力之影響

試驗使用之植物分別為番茄 (*Solanum lycopersicum*，「農友 301」，農友種苗股份有限公司) 與馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L.，P86，「阿拉斯加大葉種」)。番茄種子於發芽後移植至培養土中生長 4–5 wk 作為接種試驗使用；馬鈴薯則是使用馴化後 10 wk 之組織培養苗作為接種植物。接種使用的青枯病菌株有 RS1118 (bv 2)、RS1125 (bv 3) 及 RS1102

(bv 4)。接種方法參考 Tans-Kersten *et al*. (1998) 之土壤灌注法，並做適當修正，其方法如下：接種前先以解剖刀在植株莖基部周圍穿刺 3 個孔，製造根系傷口，再以微量吸管吸取 1 mL 青枯病菌懸浮液 (10^8 CFU mL^{-1})，平均加入孔中進行接種，每組分別接種處理 10 株番茄與馬鈴薯，試驗共進行 2 次。接種後的植株分別移入設定 20、24 及 28℃之定溫生長箱中 (照光時間白天/夜晚分別為 11 與 13 h) 定期觀察其罹病等級及發病情形。青枯病罹病指數分為 5 級，0 級：無病徵、1 級：植物有逆境徵兆、2 級：1–33% 葉片萎凋或黃化、3 級：34–66% 葉片萎凋或黃化、4 級：67–100% 葉片萎凋或黃化、5 級：植株完全萎凋 (Swanson *et al*. 2007)，再依照公式計算其罹病度 (disease severity)。

$$\text{Disease severity} = \frac{\sum ni \times i}{N \times 5} \times 100\%$$

i：發病等級；ni：發病 i 級的株數；
N：調查的總株數。

馬鈴薯品種 (系) 對青枯病之抗 (感) 病性測定

供試馬鈴薯品種 (系) 共有 10 個，其中屬於馬鈴薯品種的有 P86 (‘Kennebec’，「克尼伯」)、P90 (‘Atlantic’，「大西洋」)、P91 (‘Tss-II’，「種苗 2 號」)、P92 (‘Chipeta’，「吉比達」)、P95 (‘pike’)、P117 (‘Chipeta’，「聯華」) 與 P120 (‘TN-1’，「台農 1 號」)，而屬於品系的有 P89、16-13 及 T3 (表 1)，上述供試植物皆由行政院農委會農業試驗所嘉義分所農藝系提供。供試馬鈴薯採用薯球苗進行接種。薯球為前 1 年以組培苗繁殖後收集，經 4℃冰箱保存一段時間打破休眠。發芽之薯球切塊後，種植於 4 吋黑色塑膠軟盆中，3–4 wk 後以灌注法接種青枯病菌生化型 2 (RS1118; bv 2)，接種前先以解剖刀穿刺土壤製造 3 個根系傷口，每株加入 1 mL 細菌懸浮液 (濃度約 10^8 CFU mL^{-1})，每 1 品種接種 10 株，接種後植株置於定溫箱 (26℃/20℃) 中管理，定期依照罹病等級調查青枯病發病情形。

結果

馬鈴薯青枯病田間萎凋率調查

2013 年 11 月至 2014 年 3 月於雲林及嘉義地區共 22 處田區進行馬鈴薯青枯病罹病率調查。結果顯示其萎凋率介於 0–32% 之間，

表 1.　不同馬鈴薯品種 (系) 對青枯病菌之抗感性測試。
Table 1.　Susceptibility of potato cultivars to *R. solanacearum* (R3Bv2).

		Days of post inoculation (dpi)					
		9		20		35	
No.	Cultivar/line	Wilt (%)[z]	DS (%)[y]	Wilt (%)	DS (%)	Wilt (%)	DS (%)
P86	Kennebec	-[x]	-	10	8	50	38
P89	P89	-	-	50	44	80	72
P90	Atlantic	-	-	50	44	60	60
P91	Tss–II	10	10	10	10	30	18
P92	Chipeta	-	-	10	8	60	44
P95	Pike	-	-	50	38	80	58
16–13	16–13	10	4	50	40	100	100
T3	T3	-	-	10	8	10	10
P117	Chipeta	10	6	50	30	50	50
P120	TN–1	10	10	20	18	20	20

[z] Wilt (%): percentage of wilted plants calculated from each potato cultivar.
[y] DS (%): percentage of disease severity calculated from potato cultivar.
[x] -: no symptom was observed.

其中來自雲林地區的田區 1、2、3 及 10 之萎凋率分別為 6.4、10.8、32 及 15% (表 2)，此 4 處田區採集之罹病株於橫切莖基部之維管束均有褐化的現象，將具有維管束褐化之莖段組織直立於裝有清水之燒杯中，可發現菌流 (streaming) 自維管束中湧出。進一步利用 TTC 鑑別培養基進行分離與純化，經 27℃培養 3–4 d 後，可於培養基上發現流質狀不規則圓形或橢圓形，中間為粉紅色，外圍為乳白色之典型青枯病菌菌落型態，共分離純化 17 株菌株，並以青枯病菌之專一性引子對進行 PCR 鑑定，確認為青枯病菌 (表 2)。

生化型測定

將分離純化之 17 株菌株經碳水化合物利用能力檢測，發現其中 11 株菌株 (64.7%) 僅會對 3 種雙糖，包含乳糖、麥芽糖及纖維雙糖產生氧化作用，卻無法利用測試之 3 種六醣醇，如甘露糖、山梨聚糖醇及半乳醣醇，分類上屬於第 2 生化型菌株；其他 6 株菌株 (35.3%) 則可利用試驗之 3 種雙糖及 3 種六醣醇，分類上屬於第 3 生化型菌株 (表 2)，而此 6 株菌株分別分離自田區 1 及田區 10，而田區 2 及田區 3 分離之菌株皆為第 2 生化型 (表 2)。由測定結果可知，於 2013 年 11 月至 2014 年 3 月於雲林地區分離純化之馬鈴薯青枯病菌，分離菌株之生化型分別為 bv 2 或 bv 3。

溫度對不同青枯病菌株致病力之影響

利用青枯病菌 RS1118 (bv 2)、RS1125 (bv 3) 及 RS1102 (bv 4) 分別接種馬鈴薯及番茄，並觀察其在不同溫度下之發病情形，結果顯示在 20℃下馬鈴薯分別接種 bv 2、3 及 4 之青枯病菌後第 7 天，罹病度皆為 0%，至第 20 天為 80、0 及 77% (表 3)。番茄接種後第 7 天罹病度分別為 8、0 及 0%，第 20 天分別為 100、68 及 77% (表 4)。在 24℃下馬鈴薯接種 bv 2、3 及 4 之青枯病菌後第 4 天，罹病度分別為 18、5 及 6%，第 15 天為 85、92 及 100%，第 20 天為 98、92 及 100% (表 3)。番茄接種後第 4 天，罹病度皆為 0%，第 15 天為 92、74 及 100%，第 20 天為 92、77 及 100% (表 4)。在 28℃下馬鈴薯接種 bv 2、3 及 4 之青枯病菌後，第 4 天罹病度分別為 0、0 及 6.7%，第 15 天為 78、98 及 92%，第 20 天為 80、100 及 92% (表 3)。番茄接種後第 4 天，罹病

表 2. 雲林及嘉義地區馬鈴薯種植期 (2013 年 11 月至 2014 年 3 月) 調查田間青枯病萎凋率與其發生菌株生化型鑑定。

Table 2. Incidence of bacterial wilt of potato winter crops in Yunlin and Chiayi area (November 2013 to March 2014) and identification of *Ralstonia solanacearum* biovars.

	Potato winter crop		
Survey field	PCR[z]	Wilt (%)[y]	Biovar
Yunlin			
Field–1	+	6.4	2 (67%) & 3 (33%)
Field–2	+	10.8	2 (100%)
Field–3	+	32.0	2 (100%)
Field–4–9	-	0.0	n.d.[x]
Field–10	+	15.0	2 (45%) & 3 (55%)
Field–11–15	-	0.0	n.d.
Chiayi			
Field –1–7	-	0.0	n.d.
Total fields			2 (64.7%) & 3 (35.3%)

[z] PCR reactions were performed on the field-collected strains using specific diagnostic primers for *R. solanacearum*. +, positive amplification of a 300 bp DNA fragment; -, no amplification.
[y] Wilt (%): percentage of completely wilted plants in the surveyed field.
[x] n.d.: not detected.

表 3.　馬鈴薯接種 3 種青枯病菌生化型菌株後於不同溫度下之罹病度。

Table 3.　Response of potato plants inoculated with three biovars of *Raltonia solanacearum* under different temperatures.

	Disease severity (%) of potato[z]								
	20℃			24℃			28℃		
Days after post inoculation	RS1118 (bv 2)	RS1125 (bv 3)	RS1102 (bv 4)	RS1118 (bv 2)	RS1125 (bv 3)	RS1102 (bv 4)	RS1118 (bv 2)	RS1125 (bv 3)	RS1102 (bv 4)
4	0	0	0	6	5	18	0	0	6.7
7	0	0	0	58	28	28	13	55	63
11	38	0	18	98	80	83	47	78	90
15	65	0	51	100	92	85	78	98	92
20	80	0	77	100	92	98	80	100	92

[z] Disease severity (%) ＝ (Σ number of diseased plants in each disease index × disease index)/(total number of plants inoculated × 5) × 100%.

度分別為 0、1.7 及 20%，第 15 天為 72、92 及 100%，第 20 天為 87、92 及 100% (表 4)。

馬鈴薯品種 (系) 對青枯病之抗 (感) 病性測定

在馬鈴薯青枯病抗感病性接種測定中，選定 7 個供試品種 : P86、P90、P91、P92、P95、P117 與 P120，及 3 個品系 : P89、16-13 及 T3 進行抗 (感) 病性測定。接種後第 9 天在 P91、16-13、P117 及 P120 出現青枯病徵，其萎凋率皆為 10%，罹病度 (disease severity) 則分別為 10、4、6 及 10%；至接種後第 20 天，所有供試馬鈴薯品種 (系) 均出現青枯病徵，其中品種 P86、P91、92 及品系 16-13 之萎凋率與罹病度都未超過 10% (表 1)；接種 35d 後，罹病度在 10–100% 之間 (表 1)，顯示品種 (系) 間存在發病差異，其中罹病度達 100% 者是 16-13 品系，其次為 P89 品系之 72% 與 P90 品種 (‘Atlantic’，「大西洋」) 之 60%，罹病度最低者是 T3 品系之 10%，次低者為 P91 品種 (‘Tss-II’，「種苗 2 號」) 之 18% 與 P120 品種 (‘TN-1’，「台農 1 號」) 之 20% (表 1)。由此可知，所篩選之 10 種不同馬鈴薯品種 (系) 中並未獲得對青枯病菌 bv 2 具有高抗性之品種，但其中以 T3 品系對青枯病之耐性較其他試驗品種 (系) 強。

討論

青枯病菌為熱帶及亞熱帶地區最重要的植

表 4.　番茄接種 3 種青枯病菌生化型菌株後於不同溫度下之罹病度。

Table 4.　Response of tomato plants inoculated with three biovars of *Raltonia solanacearum* under different temperatures.

	Disease severity (%) of Tomato[z]								
	20℃			24℃			28℃		
Days after post inoculation	RS1118 (bv 2)	RS1125 (bv 3)	RS1102 (bv 4)	RS1118 (bv 2)	RS1125 (bv 3)	RS1102 (bv 4)	RS1118 (bv 2)	RS1125 (bv 3)	RS1102 (bv 4)
4	0	0	0	0	0	0	0	1.7	20
7	8	6	0	32	23	57	10	33	87
11	83	30	38	88	68	89	53	92	100
15	88	42	63	100	74	92	72	92	100
20	100	68	77	100	77	92	87	92	100

[z] Disease severity (%) ＝ (Σ number of diseased plants in each disease index × disease index)/(total number of plants inoculated × 5) × 100%.

物病原菌之一，多數之菌株於 25–30℃溫度條件下皆具有良好致病性，但於 20℃以下之環境則無致病性，僅少數的青枯病菌株於低溫下仍可感染寄主並造成危害 (Ciampi & Sequeira 1980; Milling *et al*. 2009; Bocsanczy *et al*. 2012)。由此可知，溫度的高低對青枯病菌危害寄主植物的能力具有關鍵性影響。本研究亦有一致的發現，24℃及 28℃時，所有的供試菌株在番茄植株致病力並無顯著的差異，但 20℃時，RS1125 (race 1, bv 3) 對馬鈴薯不會致病，其原因可能與青枯病菌之基因調控有關。已有研究報告指出，溫度可調控青枯病菌之致病因子 (virulence factors) 的表現，進而影響不同菌株之間於低溫時的致病力 (Bocsanczy *et al*. 2012; Bocsanczy *et al*. 2014)。然而，RS1125 (race 1, bv 3) 於 20℃時對番茄仍具有致病力，推測 RS1125 在不同寄主植物誘發病害的能力可能與兩者之間的相互作用、寄主植物對病原菌毒力因子之感受性不同有關 (Genin 2010; Genin & Denny 2012)，但仍需進行更詳細之試驗加以佐證。

低溫環境下會延緩青枯病發病時間及病徵表現，且青枯病菌容易有潛伏感染的現象，常累積大量之細菌族群於寄主植物莖部，但寄主植物卻未見病徵之表現，此現象於冷涼環境下生長之馬鈴薯普遍發生 (Allen *et al*. 2001)。於本研究中，亦發現在 20℃時接種植株表現病徵所需之時間較 24℃及 28℃生長的植株長，須於接種 7 d 之後才能觀察到病徵，其他溫度條件則於接種後 4 d 已出現病徵，至於接種後初期是否有潛伏感染的現象，則需進一步的分析。溫度亦會影響寄主之罹病度，在 20℃時其罹病度相對較低，僅有 bv 2 (RS1118) 接種馬鈴薯及番茄後之罹病度分別可達 80% 及 100%，其他生化型皆不高於 77%；所有供試菌株於 24℃接種 15 d 後其罹病度皆大於 74% 以上，在 28℃之高溫環境下時，bv 3 (RS1125) 及 bv 4 (RS1102) 菌株對馬鈴薯及番茄具有較高之致病力，於接種後 15 d 植株罹病度皆為 92% 以上，相較之下，接種 bv 2 (RS1118) 菌株的植物罹病率則低於 80%。

目前已知 R3Bv2 青枯病菌株之耐寒性較其他群菌株強 (Swanepoel 1990; Hayward 1991)，於冷涼的氣候條件下會造成嚴重病害發生 (Ciampi & Sequeira 1980)，而本研究之試驗結果亦有一致的結論，於 20℃低溫環境下，bv 2 (RS1118) 與其他試驗菌株相比，對馬鈴薯及番茄之罹病度較高。近年來，由 R3Bv2 之青枯病菌株危害台灣馬鈴薯栽培田區之案例日益增加 (Chiou 2002; Wu *et al*. 2010; Wu *et al*. 2011)，在 2013 年 11 月至 2014 年 3 月調查期間，雲林及嘉義地區馬鈴薯栽培田區發生之青枯病菌主要為 bv 2，次要菌株為 bv 3，但未發現 bv 4，說明 bv 2 菌株已成為台灣馬鈴薯生產栽培重要的限制因子之一，其餘 bv 3 及 bv 4 雖然對馬鈴薯仍具致病性，但台灣馬鈴薯生育季節以冬季為主，其重要性及危害威脅性均較 bv 2 為低。因為 bv 2 在低溫時對馬鈴薯之致病程度為最高，對馬鈴薯具有強病原性，且於低溫狀態下其殘存時間亦較其他群的菌株更長，甚至於 4℃的環境下可殘存 2 年以上 (Shamsuddin *et al*. 1978; Milling *et al*. 2009)。而分布在台灣的青枯病菌 race 1/bv 3 或 bv 4，則常於夏季或高溫多濕的氣候條件下嚴重發生 (Hsu 1991; Lin 2008)。由此可知，台灣常見青枯病菌生化型菌株中，以第 2 生化型菌株對馬鈴薯生長栽培過程中之威脅性最大。

青枯病菌為土壤傳播菌，寄主範圍及其分布皆非常廣泛，因此防治上相當困難。種植抗病品種是防治青枯病最有效的方式之一，同時也有不少致力於抗病品種育成之研究，目前國外已有數個可耐青枯病之馬鈴薯品種，分別具有不同程度之耐病表現 (French 1994; Muthoni *et al*. 2014)。然而青枯病菌仍可經由潛伏感染存在於一些抗病品種所生成之種薯中，若為中度抗性之品系則須配合健康種薯的使用，才能達到較好之防治效果 (French 1994; Grimault *et al*. 1994)。此外，青枯病菌菌株型態與特性繁多，不同菌株間之毒力強度不同，抗病品種往往會因青枯病菌的菌株差異以及環境條件的改變，如有利之發病溫度、氣候、土壤濕度或傷口的存在等因素，造成植株之抗性失效，尤其是具有菌株專一性抗性之品種 (Lebeau *et al*.

2011; Jyothi *et al*. 2012)，因此尋求適合本土生長並對在地菌株具有抗/耐性之品種更加重要。台灣目前尚未發現有效之馬鈴薯抗青枯病品種，因而針對台灣之青枯病菌株篩選具有抗性之馬鈴薯品種，有其必要性。本研究中所篩選之 10 種不同馬鈴薯品種 (系) 中，並未獲得對青枯病菌 bv 2 具有免疫抗性之品種，但品種 (系) 之間對 bv 2 表現出不同程度之耐病性，其中以 T3 品系及 P91 品種 (「種苗 2 號」) 之罹病度最低，分別為 10% 及 18%。T3 品系薯球呈長形，產量高，遺傳特性仍須作進一步分析；P91 為「種苗 2 號」，中晚生品種，薯球呈圓形，皮色土黃，抗馬鈴薯病毒 Y 及晚疫病，可鮮食及加工成洋芋片。未來將對此兩品種進行進一步之抗性分析，如對不同青枯病菌株及菌量之抗性表現、子代抗性分析、抗感病植株體內菌量之測定與分析、模擬自然環境感染條件下之抗性表現或不同溫度及環境條件對抗性之影響等，以瞭解其抗病穩定度及特性。

寄主植物與青枯病菌之間相互作用機制非常複雜，且環境因素於兩者之間的相互作用亦有極大之影響力。本研究發現溫度為影響馬鈴薯青枯病菌致病能力的因素之一，且不同生化型其影響程度亦不同。在 20℃時可使 bv 3 失去對馬鈴薯之致病力，而 bv 2 則仍具有強致病性。在 24℃、28℃時則台灣常見之 bv 2、3、4 則仍有良好之致病能力。bv 2 為目前引起馬鈴薯青枯病之最主要菌株，經由抗病品種之篩選，發現馬鈴薯品種 T3 及 P91 對青枯病菌 bv 2 具有較好之抗性，未來可做為防治馬鈴薯青枯病之參考。

誌謝

本研究承行政院農業委員會動植物防疫檢局經費補助及黃哲倫助理研究員、陳幸葵小姐、許淑麗小姐、林江美華小姐及賴素玉小姐協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

Allen, C., A. Kelman, and E. R. French. 2001. Brown rot of potatoes. p.11–13. *in*: Compendium of Potato Diseases. 2nd ed. (Stevenson, W. R., R. Loria, G. D. Franc, and D. P. Weingartner, eds.) American Phytopathological Society. Saint Paul. 106 pp.

Bocsanczy, A. M., U. C. Achenbach, A. Mangravita-Novo, J. M. Yuen, and D. J. Norman. 2012. Comparative effect of low temperature on virulence and twitching motility of *Ralstonia solanacearum* strains present in Florida. Phytopathology 102:185–194.

Bocsanczy, A. M., U. C. Achenbach, A. Mangravita-Novo, M. Chow, and D. J. Norman. 2014. Proteomic comparison of *Ralstonia solanacearum* strains reveals temperature dependent virulence factors. BMC Genomics 15:280.

Buddenhagen, I., L. Sequeira, and A. Kelman. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 52:726.

Chiou, Y. S. 2002. Characteristics of Strains *Ralstonia solanacearum* Recently Affecting Potatoes in Central Taiwan. Master thesis, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. Taichung. 46 pp. (in Chinese with English abstract)

Ciampi, L. and L. Sequeira. 1980. Influence of temperature on virulence of race 3 strains of *Pseudomonas solanacearum*. Amer. Potato J. 57:307–317.

Denny, T. P. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. p.573–644. *in*: Plant-Associated Bacteria. (Gnanamanickam, S. S., ed.) Springer. Dordrecht. 712 pp.

Elphinstone, J. G. 2005. The current bacterial wilt situation: A global overview. p.9–28. *in*: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia Solanacearum* Species Complex. (Allen, C., P. Prior, and A. C. Hayward, eds.) APS Press. Saint Paul. 528 pp.

Fegan, M. and P. Prior. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? p.449–461. *in*: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. (Allen, C., P. Prior, and A. C. Hayward, eds). APS Press. Saint Paul. 528 pp.

French, E. R. 1994. Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. p.98–113. *in*: Bacterial Wilt: The Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. (Hayward, A. C. and G. L. Hartman, eds.) CAB International. Oxfordshire. 259 pp.

Genin, S. 2010. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. New Phytol. 187:920–928.

Genin, S. and C. Boucher. 2004. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 42:107–134.

Genin, S. and T. P. Denny. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. Annu. Rev. Phytopathol. 50:67–89.

Grimault, V., G. Anais, and P. Prior. 1994. Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt. Plant Pathol. 43:663–668.

Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J. Appl. Bacteriol. 27:265–277.

Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 29:65–87.

Hayward, A. C. 2000. *Ralstonia solanacearum*. p.32–42. *in*: Encyclopedia of Microbiology, Vol. 4. (Lederberg, J., ed.) Academic Press. San Diego. 3848 pp.

He, L. Y., L. Sequeira, and A. Kelamn. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Dis. 67:1357–1361.

Hsu, S. T. 1991. Ecology and control of *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan. Plant Prot. Bull. 33:72–79. (in Chinese)

Jyothi, H. K., H. M. Santhosha, and Basamma. 2012. Recent advances in breeding for bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) resistance in tomato- review. Curr. Biotica 6:370–398.

Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. Phytopathology 44:693–695.

Kelman, A. and L. Sequeira. 1965. Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 55:304–309.

Lebeau, A., M. C. Daunay, A. Frary, A. Palloix, J. F. Wang, J. Dintinger, F. Chiroleu, E. Wicker, and P. Prior. 2011. Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: Genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. Phytopathology 101:154–165.

Lin, C. H. 2008. Application of Population Profiling and Detection of *Ralstonia solanacearum* on Integrated Management of Tomato Bacterial Wilt. Doctoral dissertation, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. Taichung. 101 pp.

McCarter, S. M. and C. A. Jaworski. 1968. Greenhouse studies on the spread of *Pseudomonas solanacearum* in tomato plants by clipping. Plant. Dis. Rep. 52: 330–334.

Milling, A., F. Meng, T. P. Denny, and C. Allen. 2009. Interactions with hosts at cool temperatures, not cold tolerance, explain the unique epidemiology of *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2. Phytopathology 99:1127–1134.

Muthoni, J., H. Shimelis, R. Melis, and Z. M. Kinyua. 2014. Response of potato genotypes to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi *et al*.) in the tropical highlands. Amer. J. Potato Res. 91:215–232.

Opina, N., F. Tavner, G. Hollway, J. F. Wang, T. H. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A. C. Hayward, V. Krishnapillai, W. F. Hong, B. W. Holloway, and J. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotech. 5:19–30.

Prior, P. and M. Fegan. 2005. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. Acta Hort. 695:127–136.

Shamsuddin, N., A. B. Lloyd, and J. Graham. 1978. Survival of the potato strain of *Pseudomonas solanacearum* in soil. J. Aust. Inst. Agric. Sci. 44:212–215.

Swanepoel, A. E. 1990. The effect of temperature on the development of wilting and on progeny tuber infection of potatoes inoculated with South African strains of biovar 2 and 3 of *Pseudomonas solanacearum*. Potato Res. 33:287–290.

Swanson, J. K., L. Montes, L. Mejia, and C. Allen. 2007. Detection of latent infections of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 in geranium. Plant Dis. 91:828–834.

Tans-Kersten, J., Y. Guan, and C. Allen. 1998. *Ralstonia solanacearum* pectinmethylesterase is required for growth on methylated pectin but not for bacterial wilt virulence. Appl. Environ. Microbiol. 64:4918–4923.

Wilson, E. E., F. M. Zeitoun, and D. L. Fredrickson. 1967. Bacterial phloem canker, a new disease of Persian walnut trees. Phytopathology 57:618–621.

Wu, Y. F., C. H. Lin, J. F. Wang, and A. S. Cheng. 2011. Population density of *Ralstonia solanacearum* potato strain, phylotype II/race 3/biovar 2, and incidence of potato bacterial wilt in fields Dounan, Yunlin County. Plant Pathol. Bull. 20:68–77. (in Chinese with English abstract)

Wu, Y. F., C. H. Lin, T. M. Chen, Y. F. Huang, S. H. Chen, J. H. Wang, and A. S. Cheng. 2010. Ecological survey of brown rot potato in Dounan, Yunlin. Plant Pathol. Bull. 19:87. (in Chinese with English abstract)

Effect of Temperature on Virulence of *Ralstonia solanacearum* Biovars and Response of Potato Cultivars (Lines) to Bacterial Wilt

Ming-Fu Chuang[1], Shu-Fung Lo[2], and Ching-Yi Lin[3,*]

Abstract

Chuang, M. F., S. F. Lo, and C. Y. Lin. 2015. Effect of temperature on virulence of *Ralstonia solanacearum* biovars and response of potato cultivars (lines) to bacterial wilt. J. Taiwan Agric. Res. 64(2):89–98.

Bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum*, is an important disease of a wide range of crops in tropical and subtropical regions. Most strains of *R. solanacearum* are pathogenic at high temperatures, and some strains are nonpathogenic when the temperature drops below 20℃. However, race 3 biovar 2 (R3Bv2) strains can attack plants at cool temperatures. In this study, we surveyed the potato fields in Yunlin and Chiayi Counties in Taiwan during 2013–2014 and observed the incidences of wilting symptoms on potato, within 0–32%. The causal pathogens were identified and most of the stains were identified to be *R. solanacearum* biovar 2, indicating that the biovar 2 is a dominant strain to affect potato in Taiwan. In addition, the effects of temperature on the virulence of three *R. solanacearum* strains (RS1102, RS1118 and RS1125) and the representative biovars affecting solanaceous crops in Taiwan were evaluated on potato and tomato plants, respectively. Results indicated that all three strains showed strong virulence on potato and tomato plants at 24℃ and 28℃, and the disease severity ranged from 77 to 100% at 20 days of post inoculation. At 20℃, the three strains showed differential reactions on the inoculated potato. Among them, RS1125 (biovar 3) was nonpathogenic to potato, whereas RS1118 (biovar 2) showed higher virulence than the other two strains with 80–100% disease severity at 20 days of post inoculation. To compare the resistance between the current commercial potato cultivars to *R. solanacearum* race 3 biovar 2, ten cultivars [P86 (‘Kennebec’), P90 (‘Atlantic’), P91 (‘Tss-II’), P92 (‘Chipeta’), P95 (‘pike’), P117, P120 (‘TN-1’), P89, 16-13, and T3] were examined in this study. It indicated a differential susceptibilities among them, from susceptible to various degrees of tolerance, to the infection of *R. solanacearum* race 3 biovar 2. The disease severity ranged between 10–100% at 35 days of post inoculation. One cultivar, T3, showed the lowest disease severity at 10%. No cultivar exhibited immunity to the bacterium. Based on our results, we concluded that temperature is one of the factors that can affect the virulence of *R. solanacearum*. Comparing the virulence of three commonly found biovars of *R. solanacearum* in Taiwan at different temperatures, we suggest that bovar 2, which showed high virulence at cool temperatures, might be a great threat to the potato production in Taiwan.

Key words: *Ralstonia solanacearum*, Biovars, Temperature, Resistant.

Received: August 14, 2014 ; Accepted: December 1, 2014.
* Corresponding author, e-mail: eris2024@dns.caes.gov.tw
[1] Former Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
[2] Associate Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
[3] Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(2):99–108 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06402.03 研究報告

白糯玉米「台農 6 號」之育成

謝光照 [1,*]

摘要

謝光照。2015。白糯玉米「台農 6 號」之育成。台灣農業研究 64(2):99–108。

玉米新品種「台農 6 號」(TAWXH97-02)，係 2000 年搜集的白糯種原 wxpop10 及 wxpop12 族群，在 2002–2004 年經人工自交 5 代所育成 S5 世代之自交系 wxpop10-84 與 wxpop12-28 雜交而成之單交種。2007 年春作從 220 個組合經組合力檢定後，根據植株、果穗外觀、產量及初步品評後選留 9 個新組合。2007 年秋作進行 9 個新品系產量比較試驗，2008 年春作–2009 年秋作在台中市霧峰區與雲林縣崙背鄉進行新品系區域試驗，2 年 4 期作共 8 個地點之區域試驗，平均顯示含苞葉鮮果穗產量 14,600 kg ha^{-1} 較對照品種 (「玉美珍」) 11,400 kg ha^{-1} 平均增產 29.4%，去苞葉鮮果穗產量 9,920 kg ha^{-1} 較對照品種「玉美珍」7,920 kg ha^{-1} 平均增產 26.8%。株型與穗型外觀整齊、果穗長 12 cm，穗徑粗大、行數 12 居多，鮮果穗產量高、黏質及皮厚薄適中等特性。TAWXH97-02 經行政院農委會農業試驗所 2013 年第 58 次研發成果管理委員會審查同意以「台農 6 號」命名及品種權申請，又於 2014 年 4 月 23 日經行政院農業委員會糧食作物及草類植物品種審議委員會第 24 次會議審議通過「台農 6 號」品種權，2014 年 6 月 12 日取得植物品種權證書。品種性狀特性為白糯質，單交種。植株第 1 葉葉鞘紅色，上位穗所在葉片與莖的夾角度小且葉片姿態呈反曲，莖無 Z 字型 (或極微 Z 字型)，支持根紅色，植株中段葉鞘綠色，株高 (210–300 cm) 為高，上位穗著生高度 (81–120 cm) 為高。雄穗開花期屬中至晚熟，雄穗穎花護穎基部深紅色，雄穗穎花護穎基部以外為淡紅色，花藥淡紅色，雄穗主軸長 (23–29 cm)，雄穗側枝長度 (17–24 cm) 為中等，雄穗主軸中段小穗著生密度為疏，主軸下段與側枝角度為中等，雄穗主軸下段側枝形狀呈稍曲，雄穗一次側枝數為中等。雌穗吐絲期屬晚至極晚熟，花絲淡粉紅色，雌穗數少，穗梗長 (12.1–18 cm)，果穗長 (19.8–26.4 cm)，雌穗直徑 (3.1–5.0 cm) 中等，果穗呈圓錐至圓筒型。籽粒行數少，籽粒類馬齒型，籽粒頂端與周邊白色，穗軸白色，籽粒排列筆直，千粒重小 (164–215 g)。

關鍵詞：白糯玉米、單雜交種、育種。

前言

玉米屬異交作物，在自然狀態大多以異型結合體的型式存在，異型結合體的種原材料，經自交過程培育成自交系，才能雜交形成 F_1 雜種。一般自交系組合力的檢定親，可以選擇遺傳基礎較廣的天然授粉品種、合成品種、雙雜交種進行頂交，淘汰大部分一般組合力較差的自交系，再以單交或測交法選出較優之雜交組合。自交系亦可用於檢測一般組合力的改良效果 (Horner *et al*.1972, 1973; Zambezi *et al*. 1986)。Darrah *et al*. (1972)、Comstock (1979) 及 Charcosset *et al*. (1990) 的研究均認為以自交系當檢定親比族群當檢定親具有較大的遺傳變異，可有效的鑑別受檢自交系組合力的高低。

糯質玉米原產於中國大陸西南各省，而雲南西雙版納等熱帶及亞熱帶地區被認為係糯質玉米的起源中心，種質資源極為豐富，為當地少數民族種植和食用的基本糯質玉米。糯質基因 (*waxy*) 位於第九條染色體上，屬主效基因 GBSS 之隱性突變，導致無法合成直鏈澱粉，

投稿日期：2014 年 8 月 11 日；接受日期：2014 年 12 月 9 日。
* 通訊作者：x486045@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所作物組研究員。台灣 台中市。

使胚乳中的澱粉幾乎為支鏈澱粉，乾燥後的糯質玉米的籽粒呈現不透明狀。白色糯質玉米不同種原的自交系間，其籽粒發芽面、非發芽面、冠蓋及整粒平均的種皮厚度 (34–204 μm) 存在極大的遺傳變異，可作為糯質玉米薄種皮改良的育種材料 (Shieh 2010)。

本所為改進並提升白糯質玉米產量與品質，期能提供較目前對照品種 (「玉美珍」) 更優之新品種供農民栽培及大眾食用，乃針對市面上白糯玉米之缺點加強選育。以鮮果穗為長穗型，外觀整齊，嫩度與味佳，甜度高，黏 Q 度好，果皮適中，口感佳為育種目標。經過自交系的培育、組合力檢定、1 年新品系比較試驗及 2 年區域試驗後，選育出白糯玉米農試育 TAWXH97-02 新品系，提出命名申請，經行政院農委會農業試驗所 2013 年第 58 次研發成果管理委員會審查同意以「台農 6 號」命名及品種權申請。

材料與方法

育成過程之試驗項目、期間及地點

自交系培育及組合力檢定：(1) 自交系的培育：2002 秋作至 2004 秋作於農試所，將台灣不同地點蒐集而得及國外引入白糯玉米 13 族群，根據植株外觀、株型、穗型、穗大小及病蟲性等，以一穗一行法進行自交系分離與選育，得 S_5 自交系。(2) 自交系一般組合力檢定：2007 春作於農試所霧峰總所，分離至 S_5 之自交系與其它族群之自交系相互雜交之 220 測交種，以「玉美珍」為對照種進行組合力檢定。田間設計為逢機排列，單行區，行長 6 m，行株距 0.80 m × 0.30 m，2 重複。

新品系比較試驗：於 2007 秋作，在台中市霧峰區及雲林縣崙背鄉二地點進行新品系比較試驗。各地之田間設計為逢機完全區集設計 (RCBD)，4 重複，4 行區，行長 6 m，行株距 0.80 m × 0.30 m。

新品系區域試驗：2008 春作至 2009 秋作，分別於霧峰與崙背進行 2 年之新品系區域試驗。各地之田間設計為 RCBD，4 重複，6 行區，行長 6 m，行株距 0.80 m × 0.30 m。

玉米重要農藝性狀之調查項目

調查項目及定義如次：開花期 (days to tasseling)，由播種起至小區中 50% 植株達雄穗始花所需日數；吐絲期 (days to silking)，由播種起至小區中 50% 植株達雌穗開始吐絲所需日數；株高 (plant height)，小區逢機取 5 株由地面至雄穗主軸頂端的平均高度，以 cm 表示；穗位高 (ear height)，小區逢機取 5 株由地面至最上位雌穗基部平均高度，以 cm 表示；穗長 (ear length)，小區收穫後逢機選取 5 個穗，量取整穗長度的平均值，以 cm 表示；穗徑 (ear diameter)，小區收穫後逢機選取 5 個穗，量取果穗中間部位寬度之平均值，以 cm 表示；籽粒行數 (row number)，小區收穫後逢機選取 5 個穗，穗上籽粒行數的平均值；果穗率 (ear percentage)，鮮果穗佔含苞葉果穗之比率；鮮果穗產量 (ear fresh weight)，小區中 50% 以植株達乳熟期時之鮮果穗重量，以 kg m^{-2} 或 kg ha^{-1} 表示；籽粒果皮厚度 (pericarp thickness)，剝取之方法，參考 Helm *et al*. (1970) 之報告稍作修正，其剝取及測定方法如下：以區域試驗採收之果穗為材料，(1) 達食用適期 (糊熟期) 之籽粒，烘乾後存放 10℃冷藏室內。(2) 剝皮時取出，然後將種子在室溫下浸水 2 d 使種子質地變軟後，再以解剖刀進行剝取果皮。沿著發芽面 (germinal；胚所在之面) 切下發芽面之果皮。(3) 剝下之果皮放置於體積比為 1 水 : 3 甘油醇 (glycerol) 溶液中，過夜。(4) 倒掉溶液，取出果皮，用吸水紙將果皮表面擦乾。(5) 利用厚薄計測量發芽面上中下 3 點之厚度，以平均值 (μm) 記錄之。

結果

自交系培育

2000 年搜集的白糯玉米種源 wxpop1–wx-pop13 族群 (「美珍」、「美珍」× ‘CML76’、「美珍」×「台南白」、「印尼」、大陸、大陸、「大陸桂單糯 2 號」、大陸、「越南」、「嘉義朴子」、「泰國種」、‘PWX90-3’、「玉美珍」) 經人工自交 5 代所選留之自交系，依據自交分離過程中植株之外觀株型、穗型、果穗大小整齊度、抗

病蟲性等性狀選育自交系，最後依種皮厚度 < 80 μm 進行篩選，合計選留 187 個 S5 世代之種皮較薄自交系，續由其中選取 85 個用於生產測交種 (表 1)。

測交種之生產與組合力檢定

2006 年秋作完成 220 個測交種種子之生產。2007 年春作從 80 個組合經組合力檢定後，根據植株、果穗外觀、產量及初步品評後選留 9 個新組合，P1-1 × P12-4 等去苞葉鮮穗重較對照種明顯增加。P13-17 × P12-28 與 P10-84 × P12-28 的去苞葉鮮穗重分別為 2.26 kg 10 ear^{-1} 與 2.40 kg 10 ear^{-1}，穗長為 20–21 cm，田間自然發病等級均為 2 級 (表 2)。

表 1. 白糯玉米自交系之種原、分離世代數量。

Table 1. Backgrounds of the white-waxy germplasm.

Code	Origin	Generation	Number	< 80 μm number
Wxpop 1	Pearl	S_5	19	4
Wxpop 2	Pearl × CML76	S_5	18	5
Wxpop 3	Pearl × TNW	S_5	20	7
Wxpop 4	Indonesia	S_5	1	0
Wxpop 5	China	S_5	17	2
Wxpop 6	China	S_5	16	4
Wxpop 7	China	S_5	84	31
Wxpop 8	China	S_5	56	8
Wxpop 9	Vietnam	S_5	0	0
Wxpop 10	Pohtzyy	S_5	41	3
Wxpop 11	Thai	S_5	9	1
Wxpop 12	PWX90-3	S_5	85	10
Wxpop 13	White pearl	S_5	31	10

表 2. 2007 年春作白糯玉米雜交種組合力檢定比較試驗農藝性狀之平均值。

Table 2. Means of agronomic traits of single-cross white-waxy in combining ability test, evaluated at Wufeng in the spring of 2007[z].

Hybrid cross	Days to tasseling (d)	Days to silking (d)	Plant height (cm)	Ear height (cm)	Ear fresh weight (kg 10 ear^{-1})	Ear length (cm)	Ear diameter (mm)	Row number (No.)	Rust (scale)
P1-1 × P12-4	56	58	230	100	2.46	22	45.0	12	1
P3-12 × P12-4	57	59	220	90	2.02	21	42.0	10	2
P8-80 × P12-28	56	58	200	90	2.16	21	40.0	10–12	2
P10-84 × P13-15	56	58	210	80	2.17	21	42.0	12–14	2
P13-17 × P12-28	55	57	195	80	2.26	20	44.0	10–12	2
P10-84 × P12-28	56	58	220	80	2.40	21	42.0	12	2
P8-76-1 × P7-69	56	58	230	110	2.00	20	41.0	10	2
P13-6 × P7-69	58	60	220	90	1.96	19	41.0	10–12	2
P13-15 × P7-69	57	59	245	115	1.83	22	40.0	8–10	2
White-pearl	55	57	205	80	2.12	18	45.0	12–14	2
$LSD_{0.05}$	2	2	11	10	0.30	2	2.0	-	1

[z] Planting date: 2007/3/2.

新品系產量比較試驗

白糯玉米經組合力檢定 (霧峰)，根據植株、果穗外觀、產量及初步品評後選留 9 個新組合，2007 年秋作新組合的開花期介於 55–59 d，吐絲期介於 56–61 d，株高介於 190–205 cm，穗位高介於 55–70 cm，含苞葉鮮穗重介於 2.95–3.78 kg 10 ear^{-1}，去苞葉鮮穗重介於 1.88–2.75 kg 10 ear^{-1}，穗長介於 19.0–22.0 cm，穗徑介於 39–45 mm，行數介於 8–16 之間。96WXH-F1 (P10-84 × P12-28) 的含苞葉鮮穗重與去苞葉鮮穗重均較對照種「玉美珍」高產；而 96WXH-F4 (P13-17 × P12-28) 的含苞葉鮮穗重較對照種「玉美珍」高產，其去苞葉鮮穗重與對照種「玉美珍」無明顯差異 (表3)。品評結果顯示，96WXH-F4 (P13-17 × P12-28) 的口感較 96WXH-F1 (P10-84 × P12-28) 好，果皮亦以 96WXH-F4 (P13-17 × P12-28) 較薄。

白糯玉米經組合力檢定，根據植株、果穗外觀、產量及初步品評後選留 9 個新組合，2007 年秋作崙背試區新組合的開花期介於 65–69 d，吐絲期介於 66–71 d，株高介於 190–210 cm，穗位高介於 55–65 cm，含苞葉鮮穗重介於 2.86–3.93 kg 10 ear^{-1}，去苞葉鮮穗重介於 1.95–2.90 kg 10 ear^{-1}，穗長介於 19.0–22.0 cm，穗徑介於 39–48 mm，行數介於 10-14 之間。96WXH-F1 (P10-84 × P12-28) 的含苞葉鮮穗重和苞葉鮮穗重均較對照種「玉美珍」高產；而 96WXH-F4 (P13-17 × P12-28) 的含苞葉鮮穗重和苞葉鮮穗重與對照種「玉美珍」無明顯差異。品評結果顯示，96WXH-F4 (P13-17 × P12-28) 的口感質地較 96WXH-F1 (P10-84 × P12-28) 為軟，果皮亦以 96WXH-F4 (P13-17 × P12-28) 較 96WXH-F1 (P10-84 × P12-28) 為薄 (表 4)。

新品系區域試驗

2008 年春作霧峰試區 (2008 年 3 月 19 日播種)：開花期以 TAWXH97-02 最晚為 54 d，其餘為 51–52 d；參試品系之吐絲期介於 53–54 d 之間；株高以「美珍」和 TAWXH97-02 最高，其次為 TAWXH97-01，最矮為「玉美珍」。穗位高以「美珍」最高，其次為「玉美珍」。含苞葉鮮果穗重以 TAWXH97-02 最高，其次為 TAWXH97-01，二者明顯的較「玉美珍」高產；去苞葉果穗重 TAWXH97-02 和 TAWXH97-01 均較對照種「玉美珍」高產。果穗率以「玉美珍」最高，較低者為 TAWXH97-02 和 TAWXH97-01。穗長以 TAWXH97-01 最長，其次為 TAWXH97-02，最短者為「玉美珍」。穗徑以 TAWXH97-02 和 TAWXH97-01 較粗，最小者為「玉美珍」(表 5)，田間銹病發生等級「玉美珍」和 TAWXH97-

表 3.　2007 年秋作白糯玉米新品系比較試驗農藝性狀之平均值 (霧峰)。

Table 3.　Means of agronomic traits of hybrids in yield trials at Wufeng in the fall crop of 2007[z].

Variety	Days to tasseling (d)	Days to silking (d)	Plant height (cm)	Ear height (cm)	Ear fresh weight (kg 10 ear^{-1}) with husk	non-husk	Ear rate (%)	Ear length (cm)	Ear diameter (mm)	Row number (No.)
96WXH-F1 (02)	55	56	205	60	3.78	2.75	72.7	20	45	10–12
96WXH-F2	56	58	205	70	2.95	1.96	66.4	21	40	8–10
96WXH-F4 (01)	57	59	200	65	3.48	2.45	70.4	22	45	10–12
96WXH-F5	59	61	200	70	2.98	1.88	63.0	19	41	8–10
96WXH-F6	56	57	190	55	3.28	2.25	68.5	20	44	8–14
96WXH-F7	59	60	200	70	3.17	2.15	67.8	19	40	10
96WXH-F8	55	56	200	70	2.95	1.90	64.4	20	39	8–12
96WXH-F9	57	59	200	60	3.38	2.19	64.7	21	45	10–12
White pearl	52	54	200	65	3.10	2.29	73.8	18	46	12–16
$LSD_{0.05}$	2	3	25	20	0.25	0.30	2.36	1.5	2	-

[z] Planting date: 2007/10/3.

表 4. 2007 年秋作白糯玉米新品系比較試驗農藝性狀之平均值 (崙背)。

Table 4. Means of agronomic traits of hybrids in yield trials at Luanbey in the fall crop of 2007[z].

Variety	Days to tasseling (d)	Days to silking (d)	Plant height (cm)	Ear height (cm)	Ear fresh weight (kg 10 ear^{-1})		Ear rate (%)	Ear length (cm)	Ear diameter (mm)	Row number (No.)
					with husk	non-husk				
96WXH-F1 (02)	68	71	195	65	3.93	2.90	73.7	22	48	10–12
96WXH-F2	66	68	195	60	3.10	2.10	67.7	20	42	8–10
96WXH-F4 (01)	67	69	190	60	3.65	2.50	68.4	20	45	10–12
96WXH-F5	69	71	190	60	3.13	1.98	63.2	20	42	10
96WXH-F6	66	67	180	50	3.20	2.45	76.5	21	41	12–14
96WXH-F7	69	71	195	65	3.27	2.30	70.3	19	40	10
96WXH-F8	65	66	195	60	2.86	1.95	68.2	20	39	10–12
96WXH-F9	67	69	210	55	3.58	2.49	69.5	20	45	10–12
White pearl	63	65	190	65	3.45	2.40	69.5	18	45	12–14
$LSD_{0.05}$	2	2	25	25	0.25	0.35	2.7	2	2	-

[z] Planting date: 2007/10/15.

表 5. 2008 年春作白糯玉米新品系區域試驗農藝性狀之平均值。

Table 5. Means of agronomic traits of hybrids in regional yield trials at Wufeng and Luanbey in the spring of 2008.

Variety	Days to tasseling (d)	Days to silking (d)	Plant height (cm)	Ear height (cm)	Ear fresh weight (kg ha^{-1})		Ear rate (%)	Ear length (cm)	Ear diameter (mm)	Row number (No.)	Rust (1–5)
					with husk	non-husk					
Wufeng (2008/03/19)											
TAWXH97-01	51	52	195	90	11,590	8,300	71.7	21.0	46.0	10–12	1
TAWXH97-02[z]	54	54	216	88	13,200	8,924	69.8	20.0	46.0	12–14	2
Pearl	51	53	218	108	10,400	7,520	75.1	19.0	44.0	12–14	2
White pearl	52	54	183	97	8,460	5,950	72.8	18.0	42.0	10–12	1
$LSD_{0.05}$	2	2	23	20	1,900	785	2.0	1.5	2.0	1.2	1
Luanbey (2008/03/12)											
TAWXH97-01	52	54	204	89	14,658	9,997	68.2	19.0	43.0	12	1
TAWXH97-02	54	56	218	86	15,700	11,209	71.4	20.0	47.0	12–14	1
Pearl	52	54	227	98	12,389	8,251	66.6	21.0	42.0	12–14	2
White pearl	54	56	199	111	12,602	8,997	71.4	20.0	39.0	8–12	2
$LSD_{0.05}$	2	2	17	15	985	850	2.5	1.5	2.0	1.2	1

[z] TAWXH97-02 = wxpop10-84 × wxpop12-28.

01 為 1 級，「美珍」和 TAWXH97-02 為 2 級。

2008 年春作雲林崙背試區 (2008 年 3 月 12 日播種)：開花期以 TAWXH97-02 和「玉美珍」最晚為 54 d，其餘為 52 d；參試品系之吐絲期介於 54–56 d 之間；株高以「美珍」和 TAWXH97-02 最高，其次為 TAWXH97-01 和「玉美珍」。穗位高以「玉美珍」最高，其次為「美珍」。含苞葉鮮果穗重以 TAWXH97-02 最高，其次為 TAWXH97-01，二者明顯的較「玉美珍」和「美珍」高產；去苞葉果穗重 TAWXH97-02 和 TAWXH97-01 均較對照種「玉美珍」和「美珍」高產。果穗率以「玉美珍」和 TAWXH97-02 較高，其次為 TAWXH97-01。穗長以「美珍」最長，其次為

TAWXH97-02，最短者為 TAWXH97-01。穗徑以 TAWXH97-02 較粗，其次為「美珍」和 TAWXH97-01，最小者為「玉美珍」，田間銹病發生等級 TAWXH97-02 和 TAWXH97-01 為 1 級，「美珍」和「玉美珍」為 2 級 (表 5)。

2008 年秋作霧峰試區 (2008 年 10 月 31 日播種)：開花期以 TAWXH97-02 最晚為 68 d，其次為 67 d，最早者為 65 d；參試品系之吐絲期介於 67–70 d 之間；株高以「美珍」和 TAWXH97-02 最高，其次為「玉美珍」，最矮為 TAWXH97-01。穗位高以「美珍」最高，其次為「玉美珍」、TAWXH97-01 及 TAWXH97-02。含苞葉鮮果穗重以 TAWXH97-02 最高產，TAWXH97-01、「美珍」及「玉美珍」無差異；去苞葉果穗重 TAWXH97-02 較對照種「玉美珍」和「美珍」高產。TAWXH97-01 與對照種無明顯差異。果穗率以「玉美珍」最高，其次為 TAWXH97-01。穗長以 TAWXH97-01 和 TAWXH97-02 最長，其次為「玉美珍」。穗徑以 TAWXH97-02 較粗，其次為「玉美珍」，最小者為「美珍」，田間銹病發生等級「玉美珍」和 TAWXH97-01 為 1 級，「美珍」和 TAWXH97-02 為 2 級 (表 6) 。

2008 年秋作雲林崙背試區 (2008 年 8 月 18 日播種)：開花期以 TAWXH97-02 和「玉美珍」最晚為 42 d，其餘為 38–40 d；參試品系之吐絲期介於 41–44 d 之間；株高以「美珍」和 TAWXH97-02 最高，其次為 TAWXH97-01 和「玉美珍」。穗位高以「玉美珍」最高，其次為「美珍」。含苞葉鮮果穗重以 TAWXH97-02 最高，其次為 TAWXH97-01，二者明顯的較「玉美珍」和「美珍」高產；去苞葉果穗重 TAWXH97-02 較對照種「玉美珍」和「美珍」高產；TAWXH97-01 則與「美珍」和「玉美珍」無差異。果穗率以「玉美珍」和 TAWXH97-02 較高，其次為 TAWXH97-01 和「美珍」。穗長以「美珍」最長和 TAWXH97-02 較長。穗徑以 TAWXH97-02 較粗，其次為 TAWXH97-01，最小者為「美珍」，田間銹病發生等級 TAWXH97-02 和 TAWXH97-01 為 1 級，「美珍」和「玉美珍」為 2 級 (表 6)。

2009 年春作霧峰試區 (2009 年 2 月 26 日播種)：開花期以 TAWXH97-02 最晚為 59 d，其次為 58 d，最早者為 57 d；參試品系之吐絲期介於 58–60 d 之間；株高以「美珍」和「玉美珍」最高，其次為，TAWXH97-02，最矮為 TAWXH97-01。穗位高以「美珍」最高，其次為「玉美珍」。含苞葉鮮果穗重以 TAWXH97-02 最高產，其次為 TAWXH97-01，二者較「美珍」和「玉美珍」高產；去苞葉果穗重 TAWXH97-02 較對照種「玉美珍」和「美珍」高產。TAWXH97-01 與對照種「美珍」和「玉美珍」無明顯差異。果穗率以「玉美珍」最高，其次為 TAWXH97-02 和「美珍」。穗長以「玉美珍」最長，其次為 TAWX97-02。穗徑以「玉美珍」較粗，其次為 TAWXH97-02，最小者為 TAWXH97-01。田間銹病發生等級 TAWXH97-01、TAWXH97-02、「玉美珍」及「美珍」均為 3 級 (表 6)。

2009 年春作雲林崙背試區 (2009 年 2 月 17 日播種)：開花期以 TAWXH97-02 最晚為 62 d，其次為 TAWXH97-01 為 61 d；參試品系之吐絲期介於 61–64 d 之間；株高以「美珍」和「玉美珍」最高，其次為 TAWXH97-02，最矮者為 TAWXH97-01。穗位高以「玉美珍」和「美珍」較高，較矮者為 TAWXH97-02。含苞葉鮮果穗重以 TAWXH97-02 最高，其次為 TAWXH97-01，二者明顯的較「玉美珍」和「美珍」高產；去苞葉果穗重 TAWXH97-01 和 TAWXH97-02 較對照種「玉美珍」和「美珍」高產。果穗率以 TAWXH97-01 和 TAWXH97-02 較高，其次為「玉美珍」。穗長以 TAWXH97-01 和 TAWXH97-02 較長。穗徑以 TAWXH97-02 較粗，其次為 TAWXH97-01，最小者為「美珍」，田間銹病發生等級 TAWXH97-02 和 TAWXH97-01 為 1 級，「美珍」和「玉美珍」為 2 級 (表 7) 。

2009 年秋作台中霧峰試區 (2009 年 9 月 2 日播種)：開花期以 TAWXH97-02 最晚為 47 d，其次為 TAWXH97-01 為 44 d；參試品系之吐絲期介於 42–49 d 之間；株高以「美珍」和「玉美珍」最高，其次為 TAWXH97-02，最矮者為 TAWXH97-01。穗位高以「玉美珍」和「美

表 **6.** 2008 年秋作白糯玉米新品系區域試驗農藝性狀之平均值。

Table 6. Means of agronomic traits of hybrids in regional yield trials at Wufeng and Luanbey in the fall of 2008.

Variety	Days to tasseling (d)	Days to silking (d)	Plant height (cm)	Ear height (cm)	Ear fresh weight (kg ha^{-1}) with husk	Ear fresh weight (kg ha^{-1}) non-husk	Ear rate (%)	Ear length (cm)	Ear diameter (mm)	Row number (No.)	Rust (1–5)
Wufeng (2008/10/31)											
TAWXH97-01	67	67	150	60	12,587	8,231	65.4	20.6	45.7	11.2	1
TAWXH97-02	68	70	166	60	14,684	9,251	63.0	20.6	47.8	12.4	2
Pearl	67	68	170	68	12,282	7,750	63.1	19.2	42.5	12.2	2
White pearl	65	68	153	60	12,064	8,167	67.7	19.7	46.0	11.8	1
$LSD_{0.05}$	2	2	20	10	1,075	985	2.5	1.6	2.0	1.2	1
Luanbey (2008/08/18)											
TAWXH97-01	38	40	127	43	14,264	8,686	60.9	19.7	44.2	11.4	1
TAWXH97-02	42	44	154	56	15,581	10,828	69.5	20.4	48.3	13.4	1
Pearl	40	41	165	62	13,145	8,084	61.5	19.8	42.1	12.6	2
White pearl	39	41	135	71	12,209	8,302	68.0	20.5	43.4	10.4	2
$LSD_{0.05}$	2	2	21	15	963	1,050	2.0	1.8	2.2	1.4	1

表 **7.** 2009 年春作白糯玉米新品系區域試驗農藝性狀之平均值。

Table 7. Means of agronomic traits of hybrids in regional yield trials at Wufeng and Luanbey in the spring of 2009.

Variety	Days to tasseling (d)	Days to silking (d)	Plant height (cm)	Ear height (cm)	Ear fresh weight (kg ha^{-1}) with husk	Ear fresh weight (kg ha^{-1}) non-husk	Ear rate (%)	Ear length (cm)	Ear diameter (mm)	Row number (No.)	Rust (1–5)
Wufeng (2009/02/26)											
TAWXH97-01	58	59	195	94	12,003	7,646	63.7	20.4	41.8	10.0	3
TAWXH97-02	59	60	209	96	14,900	9,953	66.8	21.3	44.0	11.2	3
Pearl	57	58	218	115	11,488	7,616	66.3	22.0	40.7	12.4	3
White pearl	57	58	216	102	10,706	7,590	70.9	19.4	44.9	12.4	3
$LSD_{0.05}$	2	2	20	15	875	985	3.0	1.6	2.5	1.2	1
Luanbey (2009/02/17)											
TAWXH97-01	61	63	166	79	12,504	8,279	66.2	20.2	44.9	10.6	1
TAWXH97-02	62	61	182	70	13,998	9,218	65.8	20.4	46.8	13.0	1
Pearl	60	62	193	87	11,514	6,434	55.8	19.8	40.4	11.4	2
White pearl	59	61	192	86	11,093	7,059	63.6	18.7	44.2	12.6	2
$LSD_{0.05}$	2	2	15	10	1,090	870	3.5	1.5	2.0	1.2	1

珍」較高，較矮者為 TAWXH97-02。含苞葉鮮果穗重以 TAWXH97-02 最高，較對照種「玉美珍」高產，而 TAWXH97-01 明顯的較「玉美珍」低產；去苞葉果穗重 TAWXH97-02 較對照種「玉美珍」和「美珍」高產，而 TAWXH97-01 明顯的較「玉美珍」低產。果穗率以「玉美珍」較高，其次為「美珍」。穗長以TAWXH97-02 較長，其次為「美珍」。穗徑以 TAWXH97-02 較粗，其次為「玉美珍」。田間銹病發生等級 TAWXH97-02、TAWXH97-01、「美珍」及「玉美珍」為 1 級 (表 7) 。

2009 年秋作雲林崙背試區 (2009 年 8 月 18 日播種)：開花期以 TAWXH97-02 最晚為 43 d，其次為「美珍」44 d；參試品系之吐絲期介於

38–45 d 之間；株高以「美珍」和 TAWXH97-02 最高，其次為「玉美珍」，最矮者為 TAWXH97-01。穗位高以「玉美珍」和「美珍」較高，較矮者為 TAWXH97-02。含苞葉鮮果穗重以 TAWXH97-02 最高，較對照種「玉美珍」高產，而 TAWXH97-01 與「玉美珍」和「美珍」無明顯差異；去苞葉果穗重 TAWXH97-02 較對照種「玉美珍」和「美珍」高產，而 TAWXH97-01 與「玉美珍」則無差異。果穗率以 TAWXH97-02 最高，其次為「玉美珍」。穗長以 TAWXH97-02 較長，其次為 TAWXH97-01。穗徑以「玉美珍」較粗，其次為 TAWXH97-02。田間銹病發生等級 TAWXH97-01 為 2 級，其餘 TAWXH97-02、「美珍」及「玉美珍」均為 1 級 (表 8) 。

糊熟期乾燥籽粒果皮厚度

2009 年秋作台中霧峰試區採收之果穗選取適當成熟度 (糊熟期) 之果穗，取下中段果穗之籽粒，於烘乾機烘乾，存放於冰箱中，再進行籽粒果皮厚度之測定。測量結果顯示，TAWXH97-01 果皮厚度為 75 μm，「台農 6 號」(TAWXH97-02) 果皮厚度為 95 μm，「美珍」果皮厚度為 109 μm，玉美珍果皮厚度為 78 μm。

「台農 6 號」品種性狀特性

玉米「台農 6 號」為糯質單交種，第 1 葉葉鞘紅色，上位穗所在葉葉片與莖的夾角度小 (30–45º) 且葉片姿態呈反曲，莖無 Z 字型 (或極微 Z 字型)，支持根紅色。雄穗開花期屬中至晚熟 (生長積溫 792–888℃-d)，雄穗穎花護穎基部深紅色，雄穗穎花護穎基部以外為淡紅色，花藥淡紅色，雄穗主軸中段小穗著生密度為疏，主軸下段與側枝角度為中等 (50–70º)，雄穗主軸下段側枝形狀呈稍曲，雄穗第一次側枝數為中等 (6–9)。吐絲期屬晚至極晚熟 (生長積溫 949–1,045℃-d)，花絲淡粉紅色，植株中段葉鞘綠色，雄穗主軸長 (23–29 cm)，雄穗側枝長度 (17–24 cm) 為中等，株高為高 (210–300 cm)，上位穗著生高度 (81–120 cm) 高，上位穗所在葉葉寬中等 (7.1–10.0 cm)，吐絲雌穗數少，穗梗長 (12.1–18.0 cm)，果穗長 (19.8–26.4 cm)，雌穗直徑中等 (3.1–5.0 cm)，果穗呈圓錐至圓筒型。籽粒行數少，籽粒呈類馬齒型，籽粒頂端與周邊白色，穗軸白色，籽粒排列筆直，千粒重小 (164–215 g)。

栽培應注意事項

(1) 成株銹病田間自然發病之抗性為中抗，故於銹病發生時期須於開花期前噴藥劑預

表 8. 2009 秋作白糯玉米新品系區域試驗農藝性狀之平均值。

Table 8. Means of agronomic traits of hybrids in regional yield trials at Wufeng and Luanbey in the fall of 2009.

Variety	Days to tasseling (d)	Days to silking (d)	Plant height (cm)	Ear height (cm)	Ear fresh weight ($kg\ ha^{-1}$) with husk	Ear fresh weight ($kg\ ha^{-1}$) non-husk	Ear rate (%)	Ear length (cm)	Ear diameter (mm)	Row number (No.)	Rust (1–5)
Wufeng (2009/09/02)											
TAWXH97-01	44	43	191	90	11,595	8,112	70.0	19.3	43.5	10.0	1
TAWXH97-02	47	49	206	84	15,454	10,524	68.1	22.2	46.5	13.0	1
Pearl	43	43	232	112	11,824	8,444	71.3	21.5	43.3	13.0	1
White pearl	42	42	222	101	13,062	9,952	76.1	19.0	45.7	12.5	1
$LSD_{0.05}$	2	2	15	11	1,560	1,004	2.9	1.3	1.4	1.5	1
Luanbey (2009/08/18)											
TAWXH97-01	38	40	195	93	10,764	7,104	66.0	18.5	42.5	11.0	2
TAWXH97-02	43	45	218	89	13,208	9,482	71.8	22.5	43.7	14.0	1
Pearl	39	40	221	110	9,490	5,836	61.5	18.3	35.0	13.0	1
White pearl	37	38	208	108	10,790	7,326	67.9	17.5	44.0	12.3	1
$LSD_{0.05}$	2	2.5	10	9	1,345	1,513	3.7	1.9	3.6	1.1	1

防銹病發生。(2) 栽培管理與一般食用玉米相似，此品種為白糯 (wx 胚乳型) 品種，必須與其他胚乳型類型及不同顏色品種隔離花期種植或相隔 200 m 以上，以免花粉直感效應影響果穗籽粒顏色與口感品質。(3) 建議栽培密度為 0.75 m × 0.30 m，以增加合格穗比率。(4) 此品種為單交種成熟期一致，須依銷售量分批種植。(5) 適合台灣秋作種植。

討論

台灣最近幾年流行栽培糯玉米，糯玉米是種很特殊的食用玉米，外觀有白色和黑紫，口感香粘又美味，一般消費者甚為喜愛，是一種營養豐富且色香味為一體休閒食品，每年具有很大的消費量。但因栽培的品種大部分為自然開放授粉之族群、雜交種 (「美珍」) 或與飼料玉米混雜授粉之後代，故其外觀之農藝性狀諸如花期、株高、果型、籽粒色澤、果皮厚度、甜度及口感上均具有極大的變異，造成產量和品質上參差不齊，影響消費者的購買慾望。一般甜玉米果皮厚度超過 75 μm 的玉米品種，因食用時口感粗糙，果皮殘渣多，較不能被消費者所接受 (Brewbaker *et al*. 1996)。在黑糯玉米部份經多年努力於 2005 年 11 月 29 日育成黑糯「台農 5 號」，商品名為彩虹 (Shieh & Lu 2006)。

本所以鮮果穗為長穗型，外觀整齊，嫩度及風味佳，甜度高，Q 度好，果皮適中，口感佳為白糯質玉米之育種目標。並積極從事糯質種源之蒐集和評估，且以自交系之自交培育、組合力之檢定、新品系產量比較試驗、新品系區域試驗等一序列育種程序，歷經 8 年後乃選出白糯玉米新品系 TAWXH97-02。

TAWXH97-02 鮮穗產量之表現，2008 年春作至 2009 年秋作在台中市霧峰區和雲林縣崙背鄉進行新品系區域試驗，2 年 4 期作共 8 個地點之區域試驗，平均顯示含苞葉鮮果穗產量 14,600 kg ha^{-1} 較對照品種 (「玉美珍」) 11,400 kg ha^{-1} 平均增產 29.4%，去苞葉鮮果穗產量 9,920 kg ha^{-1} 較對照品種「玉美珍」7,920 kg ha^{-1} 平均增產 26.8%，株型與穗型外觀整齊、果穗大、鮮果穗產量高、黏質及果皮厚薄適中等特性。2014 年 4 月 23 日經農委會糧食作物及草類植物品種審議委員會第 24 次會議審議通過「台農 6 號」品種權，再於 2014 年 6 月 12 日取得植物品種權證書。本品種單果穗重 (約 280–300 g ear^{-1}) 且果皮適中、Q 度好、微甜、殘渣少，穗軸較粗，適合燒烤玉米棒加工用，或其他不同消費型態之需求。

引用文獻

Brewbaker, J. L., L. B. Larish, and G. H. Zan. 1996. Pericarp thickness of the indigenous American races of maize. Maydica 41:105–111.

Charcosset, A., M. Lefort-Buson, and A. Gallais. 1990. Use of top-cross designs for predicting performance of maize single cross hybrids. Maydica 35:23–27.

Comstock, R. E. 1979. Inbred lines vs. the population as tester in reciprocal recurrent selection. Crop Sci. 19:881–886.

Darrah, L. L., S. A. Eberhart, and L. H. Penny. 1972. A maize breeding methods study in Kenya. Crop Sci. 12:605–608.

Helm. J. L., D. V. Glover, and M. S. Zuber. 1970. Effect of endosperm mutants on pericarp thickness in corn. Crop Sci. 10:105–106.

Horner, E. S., H. W. Lundy, M. C. Lutrick, and W. H. Chopman. 1973. Comparison of three methods of recurrent selection in maize. Crop Sci. 13:485–489.

Horner, E. S., W. H. Chapman, H. W. Lundy, and M. C. Lutrick. 1972. Commercial utilization of the products of recurrent selection for specific combining ability in maize. Crop Sci. 12:602–604.

Shieh, G. J. 2010. Variation of pericarp thickness in inbred lines of glutinous corn. J. Taiwan Agric. Res. 59:103–111. (in Chinese with English abstract)

Shieh, G. J. and H. S. Lu. 2006. Breeding of purple-glutinous maize hybrid ‘Tainung No.5’. J. Taiwan Agric. Res. 55:149–163. (in Chinese with English abstract)

Zambezi, B. T., E. S. Horner, and F. G. Martin. 1986. Inbred lines as testers for general combining ability in maize. Crop Sci. 26:908–910.

Breeding of White-glutinous Maize Hybrid 'Tainung No. 6'

Guang-Jauh Shieh[1,*]

Abstract

Shieh, G. J. 2015. Breeding of white-glutinous maize hybrid 'Tainung No. 6'. J. Taiwan Agric. Res. 64(2):99–108.

'Tainung No. 6', a single-cross white-glutinous maize hybrid, was bred from the hybridization of wxpop10-84 and wxpop12-28 population after 5 generations of artificial inbred during 2002 to 2004. From 220 lines of combining ability test in the spring season of 2007, 9 lines were selected from the evaluation of plant height, ear appearance and yield. 9 new lines were planted in fall season of 2007 for advanced trial, and regional trial was conducted in the spring season of 2008 and the fall season of 2009 at two locations. The results of regional trial showed that the average fresh ear yield of 'Tainung No.6' was 14,600 kg $ha.^{-1}$, higher than White Pearl 11,400 kg ha^{-1}, and the ear fresh yield without husk was 9,920 kg $ha.^{-1}$, higher than of White Pearl 7,920 kg ha^{-1}. Plant height and ear shape of 'Tainung No.6' were uniform, and the length of ear was 20 cm with 12 row. In 2013, TAWXH97-02 was permitted to apply variety right by Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), then it was registered as 'Tainung No.6' by the committee of variety right on 6 June 2014. The agronomic traits of 'Tainung No.6' are as follows. It is a white-glutinous type and single hybrid variety. The color of first leaf sheath is medium red, and angle between blade and stem is small. The leaf blade is curve in shape and the degree of zig-zag is absent or very small. Anthocyanin coloration of brace roots is medium red, and anthocyanin coloration of sheath is absent or weak green. The plant height is long and the position of upmost ear is high. As for the agronomic traits of tassel, days to tasseling is medium to late, and anthocyanin coloration at the base of glume is strong dark red. Anthocyanin coloration of glume excluding base is weak pink and anthocyanin coloration of filaments/silks is weak pink. Main axis is long and length of side branches is medium. The density of ears is loose. Angle between main axis and lateral branches is medium and lateral branches is slightly curve in shape. The number of primary lateral branches is medium. As for the agronomic trait of ear, the time of silks emergence (silking) is late to very late and the intensity of anthocyanin coloration of silks is weak pink. Ear number is few and the length of peduncle is long. Ear length is long and ear diameter is medium. Ear shape is conical-cylindrical. As for the agronomic traits of kernels, the number of rows is few and the type of kernels is dent-like. The color of top and dorsal side is white, and the intensity of anthocyanin coloration of glumes of cob is weak white. The row of kernel is straight and 1,000-kernel weight is small.

Key words: White-glutinous maize, Hybrid, Breeding.

Received: August 11, 2014; Accepted: December 9, 2014.

* Corresponding author, e-mail: x486045@tari.gov.tw
1 Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(2):109–121 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06402.04 研究報告

Xanthomonas oryzae pv. *oryzicola* 引起的水稻細菌性條斑病

陳純葳[1,*] 許秀惠[2] 張義璋[3] 謝麗娟[4]

摘要

陳純葳、許秀惠、張義璋、謝麗娟。2015。*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* 引起的水稻細菌性條斑病。台灣農業研究 64(2):109–121。

2007 年在南投縣草屯鎮及雲林縣二崙鄉田區水稻陸續出現暗綠色至黃褐色條斑的病徵，條斑上有時可見細小的黃色菌泥，後來陸續在苗栗、台中、彰化、嘉義、台南、花蓮和台東等地發現相同的病徵，從條斑處可分離出黃色細菌，菌落型態類似白葉枯病菌，經柯霍氏法確定此黃色細菌為病原，經過 16S rDNA 定序比對，結果顯示此病原細菌與水稻白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) 相似度高達 97%，與 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) 相似度達 100%，此病原細菌接種至供試水稻品種上皆造成條斑狀病徵，不同於白葉枯病菌造成的典型葉枯型病徵，且生理生化試驗測定結果得知該細菌可利用 L-Alanine，但無法生長在含有 $Cu(NO_3)_2$ 的培養基中，確認該病原細菌為 *X. oryzae* pv. *oryzicola*，可引起水稻細菌性條斑病。又於溫室接種不同水稻品種測試其抗感病性程度，結果顯示 16 個台灣常見品種均可感病，但 3 個供試菌株造成的發病程度不一，XOCH-1 菌株 (平均罹病等級為 1.8) 致病力明顯較 XOCI-1c (2.3) 及 XOCK-1b (3.1) 弱。「台稉 2 號」、「台稉 8 號」、「台稉 11 號」、「台稉 16 號」和「台南 11 號」發病率均達 100%，「台南 11 號」和「台稉16 號」平均罹病等級最高 (3.6 和 3.3)；發病率最低者分別為「高雄 145 號」(41.7%)、「台東30 號」(41.7%) 和「台稉糯 1 號」(78.3%)。測試 10 種殺菌劑在不同濃度下對該病菌的生長抑制效果，以 81.3% 嘉賜銅可濕性粉劑 400×、80% 鋅錳乃浦可濕性粉劑 1,000×，以及白葉枯病防治藥劑 10% 鏈四環黴素可濕性粉劑 1,000×、10% 克枯爛可濕性粉劑 1,000× 的效果最佳，將其稀釋液於溫室內進行防治試驗，結果顯示 4 種藥劑均能降低發病率，且接種前施用較接種後施用防治效果佳，其中以接種前 3 天施用鋅錳乃浦、接種前 7 天及前 1 天施用嘉賜銅的防治效果最佳。

關鍵詞：水稻、細菌性條斑病、細菌性條斑病菌、藥劑防治。

前言

水稻 (*Oryza sativa* Linn.) 屬於被子植物門、單子葉綱、穎花目、禾本科、稻屬，為全世界重要的糧食作物之一，僅次於小麥與玉米。依據 2010 年「聯合國國際糧農組織」(Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO) 的統計資料顯示，全球共計有 113 個國家種植水稻，總面積達 15,365 萬公頃，總產量為 6.72 億公噸，其中以中國、印度、印尼、孟加拉、越南、緬甸、泰國、菲律賓、巴西、美國等為世界稻米生產量最多的前 10 大國家 (Yang *et al*. 2012)。

在台灣，水稻也是最重要的糧食作物，據「農業統計年報」(Council of Agriculture 2014)，2013 年水稻栽培面積約為 270,165 ha，總產量為 1,589,564 Mg，兩期作之耕作面積與產量皆以稉稻為最多，秈稻次之。目前命名登記的稻品種已有282個，有177種被保存下來 (Chen

投稿日期：2014 年 7 月 31 日；接受日期：2014 年 12 月 15 日。
[*] 通訊作者：chunwei@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組聘用助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植物保護系研究員兼系主任。台灣 高雄市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組前副研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所植物病理組前技佐。台灣 台中市。

et al. 2004)，內有 28 個品種為優良推廣品種，其中 18 個為食用稉稻，2 個為食用秈稻，3 個為加工用秈稻，5 個為加工用糯稻，這些優良推廣品種目前以「台南 11 號」稉稻品種的栽培面積最廣 (Taiwan Rice Information System 2015)。

由於台灣屬高溫多濕的海島型亞熱帶氣候，病蟲害繁多，每年水稻因為病害造成的損失約 6% (Chang 2004)。根據《台灣植物病害名彙》(Taiwan Phytopathological Society 2002) 所述，台灣目前已記載有 80 種病原，主要病害為稻熱病 (rice blast)、白葉枯病 (bacterial blight; BB) 和紋枯病 (sheath blight; ShB) 等 (Chang 2004; Chen & Hseu 2009)。

2007 年第 2 期作期間 (8 月中、下旬)，分別於南投縣草屯鎮早熟糯稻田區和雲林縣二崙鄉「台南 11 號」稉稻田區，首次發現葉片上許多暗綠色或黃褐色之條斑，溼度高時條斑上可見細小的黃色菌泥 (ooze) (圖 1)，與台灣常見之細菌性病害白葉枯病 (病原菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*) 病徵略有不同，其在葉片邊緣形成波浪狀病斑，並隨著葉脈往下蔓延，在葉脈兩側形成黃化病斑之典型葉枯病徵 (圖 2B)，但與國外記載由不同病原型 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) 引起的細菌性條斑病 (bacterial leaf streak; BLS) 受葉脈侷限形成之條斑病徵相似 (Chen *et al*. 2008)，隨後陸續於台中、彰化、嘉義和台南等地發現相同的病徵。

本試驗目的主要在於確定該病害的病因，分析病原菌特性，並瞭解台灣常見水稻品種對該病害的抗感病性與現行殺菌劑對該病原菌之抑制效果，供田間防治參考。

材料與方法

病原菌分離與保存

從南投縣和雲林縣等地區採集罹病葉片，選取具上述徵狀的葉片組織，先後連續使用 75% 酒精 (10 s) 和 1% 次氯酸鈉 (NaOCl) 水

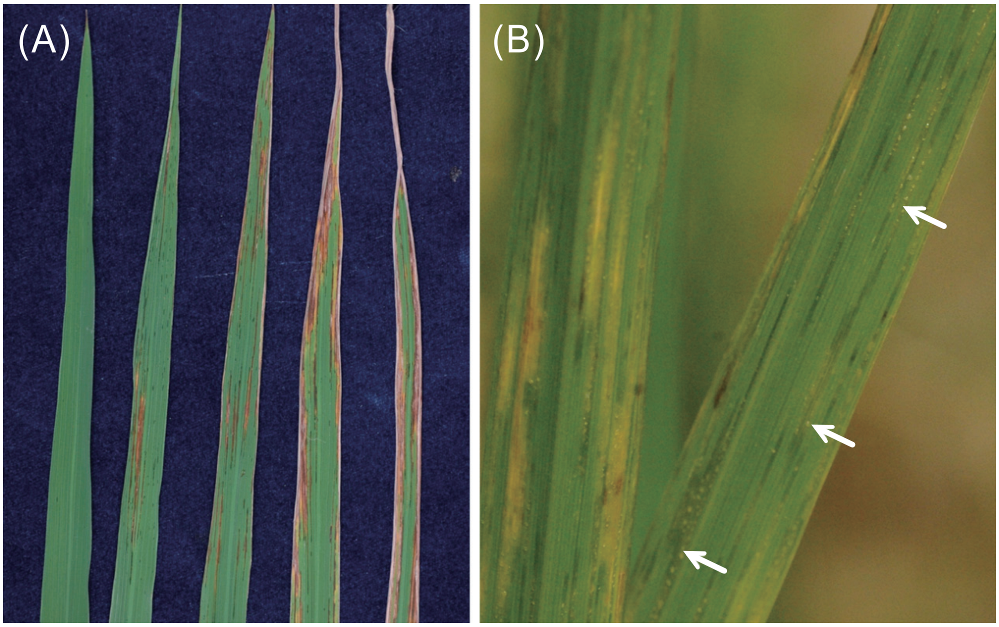

圖 1. 新病害造成水稻早熟糯稻 (A) 及「台南 11 號」稉稻 (B) 的葉上出現暗綠色至黃褐色之條斑，其上有時可見細小的黃色菌泥 (白色箭頭處)。

Fig. 1. The symptoms of dark-green to light brown translucent streak on rice leaves and bacterial oozes (indicated by white arrow) appear on the lesions under humid conditions. Rice cultivars were glutinous rice (A) and ‘Tainan 11’ (Japonica rice) (B).

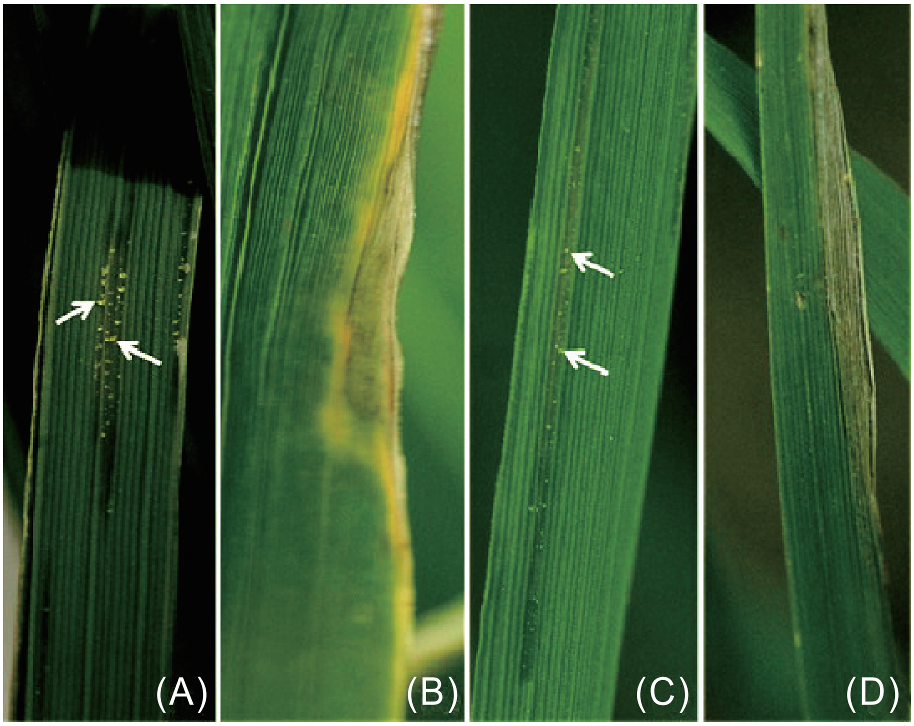

圖 2. 水稻細菌性條斑病在水稻品種「台南 11 號」稉稻上之條斑狀病徵 (A 為自然發生、C 為人工接種) 明顯不同於白葉枯病之典型葉枯型 (灰綠色病斑) 之病徵 (B 為自然發生、D 為人工接種)。白色箭頭處為黃色菌泥。

Fig. 2. Different symptoms between bacterial leaf streak (A and C) and bacterial blight of rice (B and D) on Japonica rice cultivar 'Tainan 11'. (A and B were naturally occurred symptoms in the fields; C and D were the symptoms elicited by spray inoculation; white arrows indicate bacterial oozes).

溶液 (60 s) 進行消毒，隨後以無菌水漂洗 3 次除去組織表面之次氯酸鈉，再用消毒過之剪刀將葉片組織剪成細條狀，並置於無菌水中。經震盪後以移植環沾取懸浮液，劃線於 Wakimoto's medium (WM) 平板 (potato 300 g, Bacto peptone 5 g, sucrose 20 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 20 g, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 0.5 g, agar 25 g, distilled water 1,000 mL)，並置室溫 (26℃ ± 2℃) 下 3 d 後挑取單一菌落再劃線於 WM 平板上，重複 2 次後所取得之菌株即為純化之菌株。將該純化菌株移植至含有 20% Nutrient Broth + 20% glycerol 之保存管中，置於 -80℃ 下長期保存。

病原性測定

於溫室栽植 6 個水稻品種，含「台中秈 10 號」('TCS10')、「台中秈糯 1 號」('TCSG1')、「台稉 2 號」('TK2')、「台粳糯 1 號」('TKG1')、「台南 11 號」('TN11') 及「台農 71 號」('TNG71')，待長出 3–4 片葉後進行人工接種，分別選用從台中 (F)、南投 (H)、雲林 (I) 及台南 (K) 採集得到的 XOCF-7c、XOCH-1、XOCH-2b、XOCI-1c、XOCI-3a 及 XOCK-1b 等 6 個分離菌株做為供試菌株。先將供試菌株從保存管中移植至 WM 平板上，連續移植更新培養兩次以活化病原菌，再使用無菌水製備細菌懸浮液，接種源濃度為 10^8 cfu mL^{-1} (OD_{600} = 0.35)。以噴霧接種法將細菌懸浮液均勻噴佈在水稻葉片正面上進行接種，每處理 4 重複，接種後將植株置入每小時噴霧加濕 15 min 的加濕室中保濕 1 d 再取出，隨後觀察並記錄其病徵。以白葉枯病菌 (*Xoo*) 菌株 XF89b 和無菌水作為對照組，比較病徵差異。再從接種之水稻葉片病斑中分離細菌，並將分離細菌移至含有 $Cu(NO_3)_2$ 的培養基，確認該菌無法生長於其

上，與原接種之細菌相同，而對照 *Xoo* XF89b 可以生長於其上，以完成柯霍氏法則。

16S rDNA 定序及鑑定

選取自台中、南投、雲林和台南地區採集得到的 4 個分離菌株 XOCF-6c、XOCH-1、XOCI-3c 及 XOCK-1b，在 Nutrient agar (Difco™) 平板上之單一菌落以 DNeasy plant mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) 抽取 genomic DNA 後，用細菌 16S rDNA universal primers f8-27/r1510 (Lipson & Schmidt 2004) 進行 PCR 增幅，引子濃度約 1.0 mM，分別加入 PCR 各反應物：10 mM dNTPs，1 unit/l *RealTaq* DNA polymerase (Real Biotech Corporation, Taiwan)，以及 5.0 μL 10× PCR 反應緩衝液，總體積為 50 μL。PCR 增幅條件先以 94℃反應 5 min，之後進行 94℃反應 10 s，55℃反應 30 s，70℃反應 90 s，共 30 個循環，最後再進行 72℃反應 5 min，1 個循環。增幅後之產物以 1.0–1.5% agarose 進行電泳分析，將所得之片段進行定序 (sequencing)，再將序列以 NCBI (National Center for Biotechnology Information，美國國家生物科技資料中心) 和 SDSC-Biology Workbench (加州大學之聖地牙哥分校高速電腦中心) 之 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 進行序列比對。

病原菌生理生化測定

選取供試菌株 (XOCF-7b、XOCF-8b、XOCF-9b、XOCH-1、XOCI-1a、XOCI-2c、XOCI-3b、XOCI-4a、XOCK-1a 及 XOCK-1b) 和已知的 *Xoo* (XB26、XB30、XF89b、XG19、XG38、XH2、XH24b、XM1、XM30 及 XM42) 等各 10 株，分別於 NA 平板培養基上培養 1–2 d 後，依 Garrity *et al*. (2005) 所述之方式進行各項生理生化測試，測試項目包括：格蘭氏染色 (Gram staining)、氧化/發酵試驗 (O-F test)、King's B 培養基上螢光色素的形成、YDC (Yeast extract-dextrose-$CaCO_3$) 培養基上的菌落型態、氧化酵素測定 (Oxidase test)、明膠 (Gelatin) 液化能力測定、澱粉水解能力、碳素源 (如 L-Alanine) 的利用等。

台灣水稻品種對細菌性條斑病的抗感性試驗

從推廣良質稻種或曾在台種植面積達前 10 大 (2007–2012) 之水稻品種中，選取稉稻 14 種 [「台南 11 號」(‘TN11’)、「台東 30 號」(‘TT30’)、「台稉 2 號」(‘TK2’)、「台稉 5 號」(‘TK5’)、「台稉 8 號」(‘TK8’)、「台稉 9 號」(‘TK9’)、「台稉 11 號」(‘TK11’)、「台稉 14 號」(‘TK14’)、「台稉 16 號」(‘TK16’)、「台農 71 號」(‘TNG71’)、「高雄 139 號」(‘KH139’) 及「高雄 145 號」(‘KH145’)]，秈稻 2 種 [「台中秈10號」(‘TCS10’) 及「台農秈22號」(‘TNGS22’)] 和糯稻 2 種 [「台稉糯 1 號」(‘TKG1’) 及「台中秈糯 1 號」(‘TCSG1’)] 作為供試品種種植於溫室。待生長至 3–4 片葉時，以噴霧接種法分別接種供試菌株 XOCH-1、XOCI-1c 與 XOCK-1b，接種源濃度為 10^8 cfu mL^{-1} (OD_{600} = 0.35)，每處理 4 重複，每一重複 3 棵植株。接種後將植株置入每小時噴霧加濕 15 min 的加濕室中保濕 1 d 再取出，接種後 14 d 調查各品種系之發病率與罹病等級。BLS 之罹病等級採 International Rice Testing Program (1976) 之計算方式，以病斑佔葉面積之百分率為判定依據，無病斑者為 0 級，小於 1% 者為 1 級，1–5% 者為 3 級，6–25% 者為 5 級，25–50% 者為 7 級，大於 50% 者為 9 級。

藥劑感受性試驗

利用濾紙圓盤擴散法 (paper disc diffusion method)，於 WM 平板上測定 10 種殺菌劑在不同濃度下對 *Xoo* 及 *Xoc* 病菌之感受性。以分離自水稻之 6 株供試 *Xoc* 菌株 (XOCF-8b、XOCF-9b、XOCH-1、XOCI-1c、XOCI-3b 及 XOCK-1a)，同時以本研究室確認為 Xoo 的 3 株菌株 (XF89b、XM30 及 XM42) 做為比較菌株。所有菌株分別於 WM 斜面培養基上培養 3 d 後，利用無菌水配製成細菌懸浮液 (濃度為 10^8 cfu mL^{-1}, OD_{600} = 0.35)，並加至約 40℃之 WM 培養基內，每 100 mL 培養基加入 10 mL 細菌懸浮液，混合均勻後倒成平板，俟培養基凝固後使用。供試藥劑共 10 種：鏈四環黴素 (Streptomycin tetracycline，商品名為枯萎

寧，全台農藥有限公司，10.0% 可溶性粉劑)、鏈黴素 (Streptomycin，商品名為立農黴素，立農化學股份公司，12.5% 溶液)、多保鏈黴素 (Thiophanate methyl ＋ Streptomycin，商品名為克腐，大勝化學工業股份有限公司，68.8% 可濕性粉劑)、嘉賜黴素 (Kasugamycin，商品名為嘉賜米，大勝化學工業股份有限公司，3% 溶液)；含銅類藥劑之鹼性氯氧化銅 (Copper oxychloride，商品名為健果銅，益欣公司，85.0% 可濕性粉劑)、氫氧化銅 (Copper hydroxide，商品名為克菌多，台灣杜邦股份有限公司，53.8% 水分散性粒劑)、三元硫酸銅 (Tribasic copper sulfate，商品名為銅高尚，台灣日產化工股份有限公司，27.12% 水懸劑)；含鋅錳類藥劑之鋅錳乃浦 (Mancozeb，商品名為萬生-200，台灣杜邦股份有限公司，80% 可濕性粉劑)；混合類藥劑之嘉賜銅 (Kasugamycin ＋ Copper oxychloride，商品名為輕功，大勝化學工業股份有限公司，81.3% 可濕性粉劑)；其他類藥劑之歐索林酸 (Oxolinic acid，商品名為金星，台灣住友化學公司，20% 可濕性粉劑)。分別將各藥劑稀釋成不同倍數 (表 1)，取 0.13 mL 滴於直徑 13 mm 的濾紙圓盤上，每皿放置 3 個含藥之濾紙圓盤，並以含無菌水之濾紙圓盤為對照組。在室溫下培養 3 d 後，測量抑制圈大小，若無抑制圈產生表示此藥劑在所測試的濃度對供試菌株之生長無抑制效果。

溫室藥劑防治試驗

於溫室栽植稉稻品種「台南 11 號」(‘TN11’)，待長 3–4 片葉後進行試驗。分別於接種前 7、3、1 d、接種當天和接種後 1、3、7 d 等 7 個不同時間點施用以下 4 種藥劑：81.3% 嘉賜銅可濕性粉劑 500× 水溶液、80% 鋅錳乃浦可濕性粉劑 1,000× 水溶液、10% 鏈四環黴素水溶性粉劑 1,000× 水溶液和 10% 克枯爛可濕性粉劑 (Tecloftalam，商品名為剋白尾，大勝化學工業股份有限公司) 1,000× 水溶液，其中前兩者為在培養皿中對供試病原菌之生長具有抑菌作用的化學藥劑，後兩者為植物保護手冊推薦用於防治白葉枯病的藥劑，並以水作為對照，每一處理 4 重複。分別於接種後第 14 d 調查各品種之發病率。

結果

病徵

2007 年首先於南投縣草屯鎮早熟糯稻田區和雲林縣二崙鄉「台南 11 號」稉稻田區發現葉片上可見許多暗綠色或黃褐色之條斑，溼度高時條斑上可見細小的黃色菌泥 (圖 1 右箭頭處)，在「台南 11 號」上可見病斑周圍產生黃暈 (yellow halo)，較嚴重者病斑融合呈橘黃色不規則斑 (圖 1 左)。6 個供試品種皆於接種 3–4 d 後葉面開始出現墨綠色水浸狀小點，隨後受葉脈限制往上下蔓延，呈暗綠色或黃褐色條斑 (圖 2C)，在強光照射下病斑呈半透明狀，濕度高時病斑上常附著許多細小球狀之黃色菌泥 (圖 2C)；‘TK2’ 和 ‘TN11’ 水稻品種上可見病斑周圍有黃暈產生。隨後病斑漸漸變淡褐色，部分病斑會互相融合呈橘黃色不規則斑，最後整葉枯死內捲，葉片呈灰白色，與田間病徵 (圖 1、圖 2A) 相同。

病原性測定

6 個供試菌株分別接種在 6 個供試水稻品種上皆造成條斑狀病徵 (圖 2C)，明顯與 *Xoo* 引起之病徵 (圖 2D) 不同，而與國外報導由不同病原型 *X. oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) 引起之細菌性條斑病 (BLS) 的病徵相似。再採集病斑重做組織分離，亦得到與接種時相同之黃色細菌，並將分離細菌移至含有 $Cu(NO_3)_2$ 的培養基，因無法生長於此培養基上，確認該菌與對照之 *Xoo* 不同，此結果與原接種之細菌相同，完成柯霍氏法則。

16S rDNA 定序及鑑定

以對細菌 16S rDNA 具專一性之引子對 f8-27/r1510 進行 PCR 增幅與 DNA 定序分析，再將所得序列以 BLAST 搜尋 NCBI 和 SDSC Biology Workbench database 之相似序列，結果顯示 XOCI-3c 和 XOCF-6c 2 個菌株與 *X. oryzae* pv. *oryzae* 16S rDNA partial sequences (GenBank accession number AP008229.1 for

表 1.　不同稀釋倍數各種農藥之對細菌性條斑病與白葉枯病菌生長之抑制效果。

Table 1.　Growth inhibition of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) by various agrochemicals at different dilutions.

Agrochemical[z]	Dilution fold (×)	Inhibition zone (cm in dia.; mean ± SD)			
		Xoc		*Xoo*	
Streptomycin (12.5% SL)	100	1.83 ± 0.25	EFG	2.73 ± 0.22	cd
	200	1.54 ± 0.24	HIJKL	2.53 ± 0.14	e
	400	1.15 ± 0.30	NOPQR	2.09 ± 0.16	gh
Streptomycin + Tetracycline (10% SP)	100	1.98 ± 0.13	DEF	2.14 ± 0.19	gh
	200	1.76 ± 0.13	FGH	1.91 ± 0.12	ijk
	400	1.60 ± 0.12	HIJK	1.73 ± 0.11	jklm
Thiophanate methyl + Streptomycin (68.8% WP)	500	1.53 ± 0.11	HIJKL	1.85 ± 0.09	ljkl
	1,000	1.28 ± 0.16	LMNOPQ	1.69 ± 0.09	klm
	1,500	1.12 ± 0.18	PQR	1.53 ± 0.14	n
Kasugamycin (3% SL)	100	0.11 ± 0.18	T	0.06 ± 0.10	o
	200	0.00	T	0.00	o
	400	0.00	T	0.00	o
Copper oxychloride (85% WP)	1,000	1.80 ± 0.11	FGH	0.00	o
	1,500	1.48 ± 0.17	IJKLM	0.00	o
	2,000	1.29 ± 0.18	LMNOP	0.00	o
Copper hydroxide (53.8% WG)	1,000	1.65 ± 0.13	GHIJ	0.00	o
	1,500	1.49 ± 0.12	IJKLM	0.00	o
	2,000	1.34 ± 0.16	KLMNO	0.00	o
Tribasic copper sulfate (27.12% SC)	1,000	1.13 ± 0.15	OPQR	0.00	o
	1,500	0.92 ± 0.17	S	0.00	o
	2,000	0.79 ± 0.17	S	0.00	o
Mancozeb (80% WP)	1,000	2.46 ± 0.69	ABC	3.18 ± 0.58	a
	1,500	2.36 ± 0.61	BC	2.84 ± 0.42	bcd
	2,000	2.32 ± 0.59	BC	2.94 ± 0.51	bc
Kasugamycin + Copper oxychloride (81.3% WP)	500	2.51 ± 0.31	AB	0.14 ± 0.12	o
	1,000	2.05 ± 0.25	DE	0.00	o
	1,500	1.88 ± 0.31	EFG	0.00	o
Oxolinic acid (20% WP)	1,000	1.57 ± 0.63	HIJK	2.32 ± 0.51	fg
	1,500	1.47 ± 0.62	IJKLM	2.23 ± 0.37	fgh
	2,000	1.39 ± 0.48	JKLMNO	1.82 ± 0.27	ijklm

[z] SC: Suspension concentrate; SL: Soluble concentrate; SP: Water soluble powder; WG: Water dispersible granules; WP: Wettable powder.

X. oryzae pv. *oryzae* MAFF 311018, AE013598 for *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC10331) 相似度達 97%，可惜當年資料庫中尚未有 *Xoc* 之資料可供比對。之後，再以 XOCH-1 及 XOCK-1b 2 個菌株重新進行定序鑑定，結果顯示 2 個菌株與 *X. oryzae* pv. *oryzicola* 16S rDNA partial sequences (GenBank accession number CP003057.1 for *X. oryzae* pv. *oryzicola* BLS256) 相似度達 100%。

病原菌生理生化測定

供試之病原菌在生理生化特性方面與 *Xoc*

相近，為革蘭氏陰性，短桿狀，具單一極生鞭毛，為好氣性菌，在 YDC 培養基上可產生黃色色素，於 30℃培養時產生黏稠狀 (mucoid) 菌落，在 KB 培養基上不產生螢光色素，不具有氧化酶 (oxidase)、過氧化氫酶 (catalase)、尿素酶 (urease) 及硝酸還原活性，可利用 L-Alanine，但無法生長在含有 $Cu(NO_3)_2$ 的培養基中 (表 2)。

台灣水稻品種對細菌性條斑病的抗感性試驗

16 個供試水稻品種分別接種 3 株供試菌株的結果，如表 3 所示，不同地區採集的菌株在不同品種上的發病程度不一，但可見從草屯採集的 XOCH-1 菌株致病力明顯較從雲林和台南採集的 XOCI-1c 及 XOCK-1b 菌株弱。以稉稻而言，‘TK2’、‘TK8’、‘TK11’、‘TK16’ 和 ‘TN11’ 品種發病率均達 100%，並以 ‘TN11’、‘TK16’ 和 ‘TK11’ 品種接種 3 個供試菌株後的平均罹病等級最高，分別為 3.6、3.3 及 3.2，‘TK16’ 接種 XOCK-1b 後罹病等級甚至達 5.7；其次為 ‘TK5’、‘TK14’ 和 ‘TNG71’ 品種，發病率均達 90% 以上；‘KH145’ 和 ‘TT30’ 兩品種發病率 41.7% 明顯較其他 12 種低，甚至在接種 XOCH-1 後不發病。2 個秈稻和 2 個糯稻品種均可被供試菌株感染致病，且接種 XOCK-1b 後的罹病等級較其他菌株高，甚至在秈稻品種皆達 4.0 以上，但明顯可見 ‘TKG1’ 品種的發病率 78.3% 較其他 3 個品種低。

藥劑感受性

測試結果顯示，10 種殺菌劑在不同稀釋倍數下，除 3% 嘉賜黴素溶液 200× 與 400× 稀釋液對供試之 6 個 *Xoc* 菌株、3% 嘉賜黴素溶液 100× 稀釋液對 XOCF-9b、XOCH-1、XOCI-3b 及 XOCK-1a 以及歐索林酸處理組對 XOCF-8b 的生長均無抑制效果外，其餘處理對供試 *Xoc* 之生長皆有抑制效果 (表 1)。抑制圈直徑最高可達 3.29 cm (80% 鋅錳乃浦可濕性粉劑 1,000× 稀釋液)，平均抑制效果前 5 大分別為 81.3% 嘉賜銅可濕性粉劑 500× (2.51 cm)、80% 鋅錳乃浦可濕性粉劑 1,000× (2.46 cm)、

表 **2.** 水稻細菌性條斑病菌與白葉枯病菌之生理生化測試差異。

Table 2. Physiological and biochemical characteristics that differentiate bacterial strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*).

Characteristic	Strain from rice[z]	*Xoc*[y]	*Xoo*[y]
Gram stain	–[x]	–	–
Growth in O2	Aerobic	Aerobic	Aerobic
Oxidase test	–	–	–
O-F test	Oxidative	Oxidative	Oxidative
Protein hydrolysis	+	+	+
Starch hydrolysis	–	+	+/–
Carbon source utilization			
Glycerol	–	–	–
α-Lactose	–	–	–
Inositol	–	–	–
Trehalose	+	+	+
L-alanine	+	+	–
0.001% $Cu(NO_3)_2$	–	–	+
Gelatin hydrolysis	–	+	–

[z] The tested strains isolated from rice were XOCF-7c, XOCF-8b, XOCF-9b, XOCH-1, XOCI-1a, XOCI-2c, XOCI-3b, XOCI-4a, XOCK-1a, and XOCK-1b.
[y] Data are collected from Mew & Misra (1994) and Wu (1995).
[x] +: positive reaction; −: negative reaction.

表 3. 16 個台灣水稻品種分別接種 3 株細菌性條斑病菌於 14 d 後的發病率及罹病等級。

Table 3. Disease incidence and disease index of bacterial leaf streak on 16 rice cultivars at 14 days after inoculation with 3 strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*.

	Disease incidence in% (Disease index; mean ± SD)[y]			
Rice cultivar[z]	XOCH-1	XOCI-1c	XOCK-1b	Average
Japonica rice				
KH139	87.5 (1.2 ± 0.3)	71.9 (1.5 ± 0.4)	81.3 (1.9 ± 1.0)	80.2 (1.5)
KH145	0.0	50.0 (1.0 ± 0.0)	75.0 (1.2 ± 0.3)	41.7 (1.4)
TK2	100.0 (2.0 ± 1.0)	100.0 (2.0 ± 1.0)	100.0 (3.7 ± 0.9)	100.0 (2.5)
TK5	100.0 (1.9 ± 1.0)	92.9 (1.8 ± 0.9)	100.0 (3.0 ± 0.6)	97.6 (2.2)
TK8	100.0 (1.8 ± 0.9)	100.0 (2.6 ± 0.6)	100.0 (3.5 ± 1.4)	100.0 (2.6)
TK9	87.5 (1.8 ± 0.9)	88.9 (2.5 ± 0.8)	88.9 (3.0 ± 2.0)	88.4 (2.4)
TK11	100.0 (1.8 ± 1.0)	100.0 (3.3 ± 0.8)	100.0 (4.6 ± 0.6)	100.0 (3.2)
TK14	92.3 (1.4 ± 0.6)	82.5 (2.1 ± 1.0)	100.0 (2.3 ± 0.9)	91.6 (1.9)
TK16	100.0 (1.5 ± 0.8)	100.0 (2.6 ± 1.2)	100.0 (5.7 ± 1.3)	10.0 (3.3)
TN11	100.0 (3.5 ± 0.5)	100.0 (4.1 ± 0.5)	100.0 (3.1 ± 0.5)	100.0 (3.6)
TNG71	92.9 (1.7 ± 0.9)	100.0 (2.2 ± 1.0)	92.9 (3.6 ± 1.8)	95.3 (2.5)
TT30	0.0	50.0 (1.5 ± 0.8)	75.0 (1.3 ± 0.6)	41.7 (0.9)
Indica rice				
TCS10	87.5 (1.7 ± 0.9)	100.0 (3.8 ± 0.5)	100.0 (4.0 ± 1.1)	95.8 (3.2)
TNGS22	88.9 (1.8 ± 0.9)	93.8 (2.0 ± 0.9)	100.0 (4.3 ± 1.6)	94.2 (2.7)
Glutinous rice				
TCSG1	76.9 (2.2 ± 1.0)	90.9 (2.2 ± 1.0)	100.0 (3.3 ± 1.4)	89.3 (2.6)
TKG1	75.0 (1.3 ± 0.6)	80.0 (2.2 ± 1.0)	80.0 (1.7 ± 0.9)	78.3 (1.7)
Average	80.5 (1.8)	87.6 (2.3)	93.3 (3.1)	

[z] Rice cultivars used for inoculation: KH139: 'Kaohsiung 139'; KH145: 'Kaohsiung 145'; TCS10: 'Taichung sen 10'; TCSG1: 'Taichung sen glutinous 1'; TK2: 'Tai-keng 2'; TK5: 'Tai-keng 5'; TK8: 'Tai-keng 8'; TK9: 'Tai-keng 9'; TK11: 'Tai-keng 11'; TK14: 'Tai-keng 14'; TK16: 'Tai-keng 16'; TKG1: 'Tai-keng glutinous 1'; TN11: 'Tainan 11'; TNG71: 'Tainung 71'; TNGS22: 'Tainung sen 22'; TT30: 'Taitung 30'.

[y] Disease rating methods were referred to International Rice Testing Program (1976).

80% 鋅錳乃浦可濕性粉劑 1,500× (2.36 cm)、80% 鋅錳乃浦可濕性粉劑 2,000× (2.32 cm) 和 81.3% 嘉賜銅可濕性粉劑 1,000× (2.05 cm)，效果最差者為 3% 嘉賜黴素溶液處理組，其次為 27.12% 三元硫酸銅水懸劑處理組。對 *Xoo* 而言，含銅類藥劑之鹼性氯氧化銅、氫氧化銅與三元硫酸銅無抑制效果，3% 嘉賜黴素溶液處理組亦僅 100× 稀釋液對 XM42 菌株外無抑制效果，平均抑制效果前 5 大分別為 80% 鋅錳乃浦可濕性粉劑 1,000× (3.18 cm)、80% 鋅錳乃浦可濕性粉劑 2,000× (2.94 cm)、80% 鋅錳乃浦可濕性粉劑 1,500× (2.84 cm)、12.5% 鏈黴素溶液 100× 與 200× 稀釋液 (2.73 cm 和 2.53 cm)。

溫室藥劑防治試驗

當於溫室使用 4 種藥劑進行防治試驗，結果每個處理組的發病率均比對照組 (80% 以上) 低 (表 4)，其中以接種前 3 d 施用鋅錳乃浦、接種前 7 d 及前 1 d 施用嘉賜銅的防治效果最佳，完全不發病。除接種前 3 d 施用嘉賜銅的處理組發病率達 37.5% 外，接種前施用鋅錳乃浦和嘉賜銅明顯比接種後施用的處理組發病率低，發病率為 18.8% 以下，而克枯爛要於接種前 3 d 以上才能達到相同的防治效果；鏈四環黴素於接種當天施用效果最佳，發病率為 12.5%，接種前 7 d 施用之處理組次之。

表 4. 不同藥劑與施用時間對細菌性條斑病之防治效果。

Table 4. Effect of agrochemicals under different treatment times for controlling bacterial leaf streak pathogen in rice.

Days for treatment[z]	Disease incidence (%)				
	Mancozeb 80% WP 1,000×	Kasugamycin + Copper oxychloride 81.3% WP 500×	Streptomycin tetracycline 10% SP 1,000×	Tecloftalam 10% WP 1,000×	CK (Water)
DBI 7	18.8	0.0	18.8	18.8	80.3
DBI 3	0.0	37.5	68.8	6.3	87.3
DBI 1	12.5	0.0	25.0	50.0	81.3
DAI 0	25.0	6.3	12.5	37.5	81.3
DAI 1	56.3	31.3	37.5	31.3	88.8
DAI 3	62.5	37.5	37.5	62.5	87.3
DAI 7	31.3	50.0	75.0	25.0	80.3

[z] DBI: Days before inoculation; DAI: Days after inoculation.

討論

筆者 2007 年於南投草屯、雲林二崙陸續發現水稻上出現暗綠色至黃褐色之條斑狀病徵，病斑上有時可見細小的黃色菌泥，從病斑處可分離出類似 *Xoo* 之黃色細菌，經過 16S rDNA 定序比對，結果顯示此病原細菌與 *Xoo* 相似度高達 97% 以上。然此病原細菌接種至供試水稻品種上皆造成條斑狀病徵，明顯與 *Xoo* 引起的典型葉枯型病徵不同，而與國外報導由不同病原型 *Xanthomonas. oryzae* pv. *oryzicola* 引起之 BLS 的病徵相似 (Ou 1985; Wu 1995; Niňo-Liu *et al*. 2006; Chen *et al*. 2008)，惜鑑定時資料庫未有 *Xoc* 的序列資料可供比對。之後，再以 XOCH-1 及 XOCK-1b2 個菌株重新進行定序鑑定，結果顯示 2 個菌株與 *Xoc* 相似度達 100%。Swings *et al*. (1990) 曾表示可使用下列方式來區分 *Xoc* 與 *Xoo*：(1) 在水稻上的病徵 (Ou 1985)；(2) 部分生理生化特徵差異 (Vera Cruz *et al*. 1984)；(3) 蛋白質指紋圖譜 (fingerprint) (Vera Cruz *et al*. 1984; Kersters *et al*. 1989)；(4) 脂肪酸組成 (fatty acid proflile) (Stead 1989)；以及 (5) 病原型專一單元抗體 (monoclonal antibodies) (Benedict *et al*. 1989)。本試驗的生理生化試驗結果 (表 2)， 除不能使明膠液化且無法水解澱粉外皆與 *Xoc* 相近，而與 *Xoo* 不同，且其中該細菌可利用 L-Alanine，但無法生長在含有 $Cu(NO_3)_2$ 的培養基中，皆為文獻 (Swings *et al*. 1990; Mew & Misra 1994; Wu 1995; Garrity *et al*. 2005; Chen & Hseu 2013) 中記載 *Xoc* 和 *Xoo* 不同之處。明膠液化與澱粉水解能力結果與文獻不同，其原因可能是供試菌株跟國外菌株之間存有差異，也可能受試驗方法或紀錄結果之日數不一所影響。綜合上述病徵表型、16S rDNA 定序比對及生理生化測定結果，顯示引起台灣水稻早熟糯稻和「台南 11 號」條斑狀病徵的病原細菌為 *X. oryzae* pv. *oryzicola*。筆者目前已在苗栗、台中、彰化、雲林、嘉義、台南、花蓮和台東發現本病害發生，田間已發現的罹病品種有早熟糯稻、「台中秈 17 號」(‘TCS17’)、「台東 31 號」(‘TT31’)、‘SA169’、‘TCS10’、‘TK2’、‘TK16’、‘TN11’、‘TNG67’、‘TNG70’、‘TNG71’ 和 ‘TNGS22’，多屬稉稻 (Chen *et al*. 2008; Chen *et al*. 2009)。

由 *Xoc* 所引起之 BLS，早在 1918 年即有文獻報導，當時尚未確認病原菌 (Reinking 1918)，直至 1957 年大陸學者 Fang *et al*. (1957) 將此病害正式命名為細菌性條斑病，病原菌為 *Xanthomonas oryzicola*，直至 1990 年才由 Swings *et al*. (1990) 重新命名為 *X. oryzae* pv. *oryzicola*。本病害主要分佈於菲律賓、中國南方地區、泰國、馬來西亞、印度、越南、印尼、西非部分國家等地區 (Ou 1985; Sood & Aggarwal 2002; Niňo-Liu *et al*. 2006)。*Xoc* 可危害水稻全生育期，感染水稻劍葉或小花時，造成子房、雄蕊、胚乳呈褐色或黑色壞死，

穎片褐變，進而影響水稻產量 (Shekawat & Srivastava 1972)。據報導 BLS 可造成減產 10–30% 左右，嚴重者甚至可達 60% 以上 (Wu 1995)。在台灣，BLS 主要發生在第 2 期作，直至 2012 年才在花東地區發現第 1 期作為害，於水稻田區呈不均勻分佈，且多與白葉枯病 (BB) 共同為害。本病害的發病條件類似 BB，於高溫多濕、高氮肥的環境下易發生 (Ou 1985; Sood & Aggarwal 2002; Niňo-Liu *et al*. 2006)，26–30.5℃適合發病 (Sood & Aggarwal 2002)，且 *Xoc* 可藉由帶菌種子傳播 (Ou 1985; Sood & Aggarwal 2002; Niňo-Liu *et al*. 2006)，BLS 在台灣有可能造成嚴重危害 (Chen & Hseu 2009)。

筆者於溫室測試 16 個台灣水稻品種對 *Xoc* 之感病性，來研判將來 BLS 在台灣可能危害程度，結果發現秈稻、粳稻與糯稻皆感病，但不同地區採集的菌株在不同品種上的發病程度不一。粳稻中 ‘TK2’、‘TK8’、‘TK11’、‘TK16’ 和 ‘TN11’ 品種發病率均達 100%，其次為 ‘TK5’、‘TK14’ 和 ‘TNG71’ 水稻品種，平均發病率分別為 97.6、91.6 及 95.3%。‘KH145’ 和 ‘TT30’ 兩品種發病率 41.7% 明顯較其他 12 種低，甚至接種 XOCH-1 時不發病；2 個秈稻和 2 個糯稻品種均可被供試菌株感染致病，‘TKG1’ 品種的發病率 78.3% 明顯較低，但 4 個品種接種 XOCK-1b 後的罹病等級較另兩個菌株高。其中 ‘TK2’、‘TN11’ 和 ‘TK8’ 同時為良質米推薦品種與 2007–2012 年種植面積前 10 大之品種 (TRIS)，使 BLS 在台嚴重發生具有潛力。Goto (1965) 曾表明水稻品種間的抗感病性差異明顯，認為稉稻較秈稻和糯稻抗病，而 Ou *et al*. (1970) 認為秈、稉稻皆無抗性，本試驗的結果較似後者。然亦有報導指出，同一品種和不同類型與來源的稻種對 BLS 的抗感性在不同地區表現有很大的差異 (Zeng & Lin 2003)，這些差異可能與檢測方式 (如供試水稻株齡) 及供試菌株不同有關。本試驗結果亦發現使用不同菌株結果呈現不同的抗感性，未來如要進行其他品種的抗感性測試時，必須注意供試菌株的選擇。

有關 BLS 的藥劑防治研究較少，多建議使用 BB 的防治藥劑即可 (Niňo-Liu *et al*. 2006)，國外曾報導施用 Vitavax (0.15–3.0%) 可有效防治本病 (Sood & Aggarwal 2002)，大陸學者 Xing & He (2007) 也曾於室內測定新殺細菌劑噻森銅 (Saisentong) 對 *Xoo* 和 *Xoc* 的抑制能力，結果與田間已用來防治 BB 及 BLS 的藥劑噻枯唑 (bismerthlazol) 差異不顯著。為提供農民可使用之防治藥劑，筆者從可抑制 *Xoc* 生長的 10 種不同濃度之殺菌劑 (Chen *et al*. 2009) 中選取抑制效果最佳的藥劑嘉賜銅和鋅錳乃浦，與已推薦使用在防治白葉枯病的藥劑鏈四環黴素和克枯爛於溫室進行防治試驗。結果顯示，4 種藥劑均能降低發病率，且接種前施用較接種後施用防治效果佳，其中以接種前 3 d 施用鋅錳乃浦、接種前 7 d 及前 1 d 施用嘉賜銅的防治效果最佳，完全不發病。目前除嘉賜銅未推薦使用在水稻上，田間仍可以使用鏈四環黴素與克枯爛來同時防治本病害及 BB，80% 鋅錳乃浦可濕性粉劑亦已被用來防治水稻稻熱病，使用濃度 (稀釋倍數 500×) 比溫室試驗 (1,000×) 所使用的更高，可以用於田間防治 BLS。除此之外，亦配合清除雜草、病組織翻埋入土中並淹水、勿施用過多氮肥等農事操作，並應注意稻種消毒工作，以降低 BLS 在田間發生之機率 (Faan & Wu 1965; Ou 1985; Lin *et al*. 1995; Chen & Liu 2007; Chen & Hseu 2009)。

引用文獻

Benedict, A. A., A. M. Alvarez, J. Berestecky, W. Imanaka, C. Y. Mizumoto, L. W. Pollard, T. W. Mew, and C. F. Gonzalez. 1989. Pathovar-specific monoclonal antibodies for *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* and for *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*. Phytopathology 79:322–328.

Chang, Y. C. 2004. The ecology and control of major diseases of rice in Taiwan. p.75–101. *in*: Proceeding of 2004 Symposium on Rice Health Management. September 8, 2004. Taichung, Taiwan. Agriculture Development Foundation, Taipei. (in Chinese with English abstract)

Chen, C. G., M. H. Lai, C. P. Li, C. S. Tseng, and H. M. Yen. 2004. Introduction of rice breeding career and property of major varieties in Taiwan. p.33–40. *in*: Proceeding of 2004 Symposium on Rice Health

Management. September 8, 2004. Taichung, Taiwan. Agriculture Development Foundation, Taipei. (in Chinese with English abstract)

Chen, C. W. and S. H. Hseu. 2009. Bacterial diseases of rice in Taiwan. p.45–64. *in*: Proceedings of Symposium on Achievements and Perspectives of Rice Protection in Taiwan. July 9, 2009. Chiayi, Taiwan. Taiwan Agric. Res. Inst., Taichung. (in Chinese with English abstract)

Chen, C. W. and S. H. Hseu. 2013. Detection techniques of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae, X. oryzae* pv. *oryzicola* and *Burkholderia* glumae from rice. p.47–67. *in*: Proceedings of Special Issue or the Symposium on Important Crop Pathogen Detection and Management. October 18, 2013. Taichung, Taiwan. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Taichung. (in Chinese with English abstract)

Chen, C. W., S. H. Hseu, L. J. Hsieh, and Y. C. Chang. 2008. Bacterial leaf streak of rice- a new disease in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 17:82. (in Chinese)

Chen, C. W., Y. N. Chen, and S. H. Hseu. 2009. The selection of resistance rice varieties and control agrochemicals to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. Plant Pathol. Bull. 18:75. (in Chinese)

Chen, X. and H. M. Liu. 2007. Effect of treating sick straw on control of bacterial leaf streak of rice. Plant Doctor 20:23. (in Chinese)

Council of Agriculture. 2014. Agricultural Statistics Yearbook 2013. Council of Agriculture Press. Taipei. 345 pp. (in Chinese)

Faan, H. C. and S. C. Wu. 1965. Field control of bacterial leaf streak (*Xanthomonas oryzicola*) of rice in Kwantung. Acta Phytopath. Sin. 4:1–6. (in Chinese with English abstract)

Fang, C. T., H. C. Ren, T. Y. Chen, Y. K. Chu, H. C. Faan, and S. C. Wu. 1957. A comparison of the rice bacterial leaf blight organism with the bacterial leaf streak organisms of rice and *Leersia hexandra* Swartz. Acta Phytopathol. Sin. 3:99–124. (in Chinese with English abstract)

Garrity, G. M., J. A. B. Bell, and T. Lilburn. 2005. Family I. Xanthomonadaceae fam. nov. p.63–90. *in*: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Part B. (Garrity, G. M., ed.) Springer. New York. 1108 pp.

Goto, M. 1965. Resistance of rice varieties and species of wild rice to bacterial leaf blight and bacterial leaf streak diseases. Philippine Agr. 9:329–338.

International Rice Testing Program. 1976. Standard Evaluation System for Rice. 2nd ed. The International Rice Research Institute. Laguna. 64 pp.

Kersters, K., B. Pot, B. Hoste, M. Gillis, and J. De Ley. 1989. Protein electrophoresis and DNA: DNA hybridizations of xanthomonads from grasses and cereals. Bull. OEPP 19:51–55.

Lin, B. R., S. C. Wu, S. H. Huang, L. X. Zeng, X. M. Xu, S. C. Wang, and L. R. Lin. 1995. Study on control rice bacterial leaf streak by seed disinfection and using pesticide at seedling stage. Guangdong Agric. Sci. 9:37–39. (in Chinese)

Lipson, D. A. and S. K. Schmidt. 2004. Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the Colorado Rocky Mountains. Appl. Environ. Microbiol. 70:2867–2879.

Mew, T. W. and J. K. Misra. 1994. A Manual of Rice Seed Health Testing. Int. Rice Res. Inst. Laguna. 113 pp.

Niňo-Liu, D. O., P. C. Ronald, and A. Bogdanove. J. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: Model pathogens of a model crop. Mol. Plant Pathol. 7:303–324.

Ou, S. H. 1985. Rice Diseases. Commonwealth Mycological Institute. Surrey. 380 pp.

Ou, S. H., G. P. Franck, and S. D. Merca. 1970. Varietal resistance to bacterial leaf streak disease of rice. Philippine Agriculturist 54:8–32.

Reinking, O. A. 1918. Philippine economic plant diseases. Philippine J. Sci. A 13:165–274.

Shekawat, G. S. and D. N. Srivastava. 1972. Mode of infection in bacterial leaf streak of rice and histology of the diseased leaf. Phytopathol. Zeitschrift 74:84–90.

Sood, A. K. and P. Aggarwal. 2002. Bacterial diseases of field crops. p.333–337. *in*: Diseases of Field Crops. (Gupta, V. K. and Y. S. Paul, eds.) Indus Publishing Company. New Delhi. 464 pp.

Stead, D. E. 1989. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars of cereals and grasses by fatty acid profiling. Bull. OEPP 19:57–68.

Swings, J., M. Van Den Mooter, L. Vauterin, B. Hoste, M. Gillis, T. W. Mew, and K. Kersters. 1990. Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae)* and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. nov., nom. rev. Intl. J. System. Bacteriol. 40:309–311.

Taiwan Phytopathological Society. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. Taiwan Phytopathological Society Press. Taichung. 386 pp. (in Chinese)

Taiwan Rice Information System. 2015. Rice Registered Varieties Database. TRIS. Taichung. http://210.69.150.233:8080/default.jsp (visit on 7/6/2009)

Vera Cruz, C. M., F. Gossele, K. Kersters, P. Segers, M. Van Den Mooter, J. Swings, and J. De Ley. 1984. Differentiation between *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae, Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola* and the bacterial 'brown blotch' pathogen on rice by numerical analysis of phenotypic features and protein gel electrophoregrams. J. Gen. Microbiol. 130:2983–2999.

Wu, S. C. 1995. Bacterial leaf streak of rice. p.25–27. *in*: The Pests of Crop in Chinese. 2nd ed. (Chinese Academy of Agricultural Sciences Institute of Plant Protection, ed.) China Agriculture Press. Beijing. 1306 pp. (in Chinese)

Xing, J. H. and R. L. He. 2007. Bioactivity of saisentong on rice bacterial blight and bacterial leaf streak disease. Agrochem. Res. Appl. 11:31–32.

Yang, J. L., J. C. Cheng, and S. C. Sheng. 2012. Profile of global rice production and marketing. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Stat. 76:4–8. (in Chinese)

Zeng, J. M. and W. X. Lin. 2003. Research progress on rice bacterial leaf streak and its resistance. Mol. Plant Breed. 1:257–263.

Bacterial Leaf Streak of Rice Caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Fang *et al.*) Swings *et al.* in Taiwan

Chun-Wei Chen[1,*], Shiow-Huey Hseu[2], Yih-Chang Chang[3], and Lih-Jiuan Hsieh[4]

Abstract

Chen, C. W., S. H. Hseu, Y. C. Chang, and L. J. Hsieh. 2015. Bacterial leaf streak of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Fang *et al.*) Swings *et al.* in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 64(2):109–121.

In 2007, a new disease of rice was found in Nantou and Yunlin Counties in Taiwan. The symptoms exhibited dark-green to light brown translucent streak on rice leaf, and bacterial oozes appear on the lesions under humid conditions. This disease was later found in Miaoli, Taichung, Changhua, Chyayi, Tainan, Huailien, and Taitung Counties in Taiwan. Results from 16S rDNA sequencing and comparison revealed that the nucleotide sequences shared 97% similarity with the ones of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), and 100% similarity with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* BLS256. Based on the symptoms and pathological studies, 16S rDNA sequencing, and physiological and biochemical analyses, the pathogen was identified as *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*). The susceptibility of rice cultivars to bacterial leaf streak (BLS) were tested in greenhouse. Sixteen rice cultivars were susceptible, but the disease incidence and index were different when inoculating with different *Xoc* strains. The virulence of *Xoc* strains XOCH-1 (disease index was 1.8) was lower than XOCI-1c (2.3) and XOCK-1b (3.1). The disease incidence of rice cultivars 'Taikeng 2', 'Taikeng 8', 'Taikeng 11', 'Taikeng 16' and 'Tainan 11' were 100%. Among them, the highest disease index was 3.6 for 'Tainan 11' and was 3.3 for 'Taikeng 16'. The disease incidence of 'Kaohsiung 145' (41.7%), 'Taitung 30' (41.7%) and 'Taikeng glutinous 1' (78.3%) were lower than the other thirteen cultivars. Besides, ten commercial agrochemicals were tested and results showed that they can almost inhibit the growth of all tested *Xoc* strains. Among those, four agrochemicals could control BLS disease in greenhouse, especially spraying Mancozeb and Kasugamycin + Copper oxychloride before inoculation.

Key words: Rice, Bacterial leaf streak, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, Chemical control.

Received: July 31, 2014; Accepted: December 15, 2014.
* Corresponding author, e-mail: chunwei@tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
3 Former Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
4 Former Technical Specialist, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(2):122–134 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06402.05
研究報告

利用反應曲面法進行蝴蝶蘭種苗生理特性檢測之研究

邱健誠[1]　謝廷芳[2]　蔡致榮[3]　戴廷恩[4,*]

摘要

邱健誠、謝廷芳、蔡致榮、戴廷恩。2015。利用反應曲面法進行蝴蝶蘭種苗生理特性檢測之研究。台灣農業研究 64(2):122–134。

蝴蝶蘭是我國目前主要外銷花卉作物之一，主要銷往美國、日本及荷蘭，然而種苗品質一直無法提昇，主要原因在於未能掌握品種生理特性，營造適性培育環境。本研究開發蝴蝶蘭品種生理檢測技術，用以測定蝴蝶蘭種苗營養生長及催花之最佳環境需求條件 (如日、夜溫度及光照強度等)，提供國內業者代工及外銷國接力生產栽培之參考依據。為降低檢測時間及次數，本研究設計多箱光合作用全植株連續式檢測系統，配合反應曲面法之應用，建立檢測技術。蝴蝶蘭 *Phalaenopsis* Sogo Yukidian '1318'、*P.* Sogo Plum 'F2486'、*P.* Taida Smile 'Taida Little Green' 及 *P.* Nobby's 'Cat Nip' 等 4 個品種系經本生理檢測技術平台測試後，各品種系營養生長期預估之最適日夜溫條件分別為 28/23℃、33/24℃、33/27℃及 33/28℃；預估最適光強度除 'F2486' 為 100 μmol m^{-2} s^{-1} 外，其餘均為 225 μmol m^{-2} s^{-1}，相關數據已提供業者驗證。惟因生長箱模擬環境與溫室栽培環境存有差異，且試驗因設備限制而分批進行，植株生育整齊度亦為影響因子，因此未來檢測技術仍需持續改良與驗證。

關鍵詞：光合作用、全株量測、品種特性、反應曲面。

前言

蝴蝶蘭為蘭科 (Orchidaceae) 蝴蝶蘭屬 (*Phalaenopsis*) 植物，原生於澳洲北部及東南亞地區，主要分布於菲律賓呂宋島南部山區及台灣恆春半島、蘭嶼及台東海岸山脈等地 (Lin 1988)。台灣為 *P. aphrodite* subsp. *Formosana* 及 *P. equestris* 之原生地 (Christenson 2001)，前者在 1952 及 1953 年連續奪得國際蘭展冠軍而聲名大噪 (Lo 2003)。台灣因氣候適宜，頗適於發展蝴蝶蘭產業，早期許多趣味者收集了豐富種原並育成許多優良雜交種 (Tsai & Chu 2001)，豐富的品種資源配合精良的栽培技術奠定了台灣在國際蘭界重要的地位，也贏得「蝴蝶蘭王國」的美名。目前，蝴蝶蘭為台灣花卉產業中最重要的花卉之一，即使在競爭激烈的國際花卉市場中，仍能佔有一席之地，帶來可觀的外銷收入。依行政院財政部關務署進出口統計資料顯示，2013 年蝴蝶蘭出口值達 1.18 億美元，占總花卉出口值的 62.41% (Customs Administration, Ministry of Finance 2013)，蝴蝶蘭成為國內出口值破億美元的農產品。然而，支持著此番榮景的品種優勢，卻也是當前外銷的一大困擾。許多品種依然存在著問題，例如適合栽培及開花等環境條件及生長特性不夠了解 (Chen & Lin 2012)，即使是同一品種來源的植株也難免品質不一，對於接手栽培的廠商乃至於消費者便無法提供最適當的環境條件資訊。Chen *et al*. (2012) 指出，在不同環境條件下栽培的植株，其性狀之表現

投稿日期：2014 年 10 月 16 日；接受日期：2014 年 12 月 19 日。
* 通訊作者：tedai@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所花卉研究中心研究助理。台灣 雲林縣。
[2] 農委會農業試驗所花卉研究中心研究員兼中心主任。台灣 雲林縣。
[3] 農委會農業試驗所研究員兼副所長。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所花卉研究中心研究員兼系主任。台灣 雲林縣。

即可能有所不同。因此在品種特性無法確定的情況下，台灣蝴蝶蘭的品質穩定性必然遭受質疑。基於產業界的需求，行政院農委會農業試驗所花卉研究中心嘗試進行蝴蝶蘭生理檢測技術之開發，以協助業者確認各品種較適當的栽培環境條件，以利國內業者乃至於國外接力栽培的廠商都能生產優良的植株，充分發揮該品種應有特性與價值，穩定並強化消費者對台灣優良蝴蝶蘭種苗的信心。

植物生長以光合作用為基礎，光合作用是植物重要的生理過程，氣體交換特性之研究，常被用來探討植物生長與環境間的關係 (Shen *et al*. 2010)。因此，生理檢測可先著重在各環境條件下植株的光合作用能力變化，而光合作用可利用二氧化碳 (carbon dioxide; CO_2) 及碳水化合物等物質之變化來評估，考量非破壞性且連續檢測的試驗需求，CO_2 應是較理想的測定對象。開放式氣體循環檢測，可以應用於長期的氣體變化量測，並與單一葉片光合作用量測方法互補。利用複合量測箱，更可以重複量測或是同時比較不同環境或栽培處理，對於作物生育因子之影響 (van Iersel & Bugbee 2000)，所以光合作用研究者常針對試驗需求自行設計適合的系統 (Aker *et al*. 1985; Knight *et al*. 1988; Day 1990; Miller *et al*. 1996; van Iersel & Bugbee 2000; Klingeman *et al*. 2005; Chen & Lin 2012; He & Li 2014)。由於影響光合作用的環境因子繁多，逐一檢測顯然不符成本效益，且延長試驗時間亦會造成植株生長勢差異而導致試驗誤差，故嘗試以反應曲面法 (response surface methodology; RSM) 協助分析試驗結果，據以估算植株的最佳化環境條件。反應曲面法是一套結合統計分析與試驗設計的技術，透過一系列有系統的試驗，搜尋反應的最適化條件 (Wu 2008)，藉由一定量的試驗結果來預測條件範圍內的最適結果，以及達成該結果的條件，以取代逐一試驗，故可以最少的試驗次數來達成目的 (Su 2005)。此法目前已廣泛應用在農業、食品、化學工業、生物科技等領域 (Chen & Peng 1996; Liu & Peng 2002; Chandrika & Shahidi 2005; Hsu & Hong 2005; Wu 2008; Chiu *et al*. 2013)。

本研究之目的在於利用自行設計檢測設備並配合反應曲面法之應用，評估其在蝴蝶蘭種苗生理特性檢測之可行性，經由植株最適栽培環境條件之推估，提供生產者參考，並提昇種苗品質穩定度。

材料與方法

生理檢測系統之建置

檢測系統主要參考Weng & Chen (1982)、Chiang (1983) 及Long & Hällgren (1985, 1993) 等設計原理，再依試驗材料需求及儀器特性加以修改。

為求監測全株的 CO_2 交換量，本試驗以大型壓克力箱 (內徑長 × 寬 × 高約 = 0.60 m × 0.50 m × 0.30 m) 作為植株試驗空間，並將壓克力箱置於生長箱 (FH-130, HIPOINT Company, Taiwan) 內，由生長箱控制試驗所需的溫度、濕度及光照。其中，溫度控制精度 ± 0.5℃ (25℃時)，濕度控制精度 ± 3% (80%，25℃時)，光週期為 12 h，日夜變化轉換期設定 1 h 之內模擬日照平均漸亮及漸暗。光輻射值 (即光強度) 以輻射計 (LI-1400, LI-COR, Inc., USA) 測量壓克力箱中間位置，植株最上位葉高度的光強度，經由燈管開啟數量調整光輻射值。

本試驗設計需長時間監測 CO_2 變化，故採用開放式氣體循環系統，抽氣馬達 (ACO-818, Zhejiang Sensen Industry Co., Ltd., China) 自溫室外高約 5 m 處抽取空氣送入生長箱，以流量計 (flow meter, RMA-22-SSV 和 RMA-26-SSV, Dwyer Instruments, Inc., USA) 控制流率約 13–15 L min^{-1}，再以馬達 (TA-318 和 TA-388D, TAKAOKA, Japan) 抽取生長箱及壓克力箱空氣，流率分別控制在約2 及9 L min^{-1} (圖 1)，以二氧化碳/水汽分析儀 (CO_2/H_2O analyzer, LI-840A, LI-COR, Inc., NE, USA) 測定二氧化碳濃度。

植株最適馴化與測量時間之試驗

試驗材料為購自世芥蘭業公司的 *P.* Sogo Yukidian 'F1442' 3.5 吋盆成熟株。植株購入後，以葉面積儀 (AM-300, ADC BioScientific

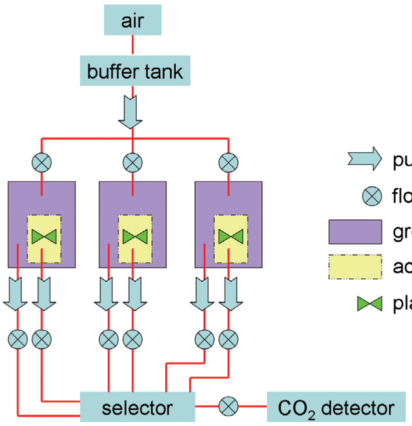

圖 1.　生理檢測系統架構簡圖。

Fig. 1.　The diagram of physiological examination system.

表 1.　本研究之試驗變數及位準設計。

Table 1.　Coded levels for the independent variables.

Independent variable	Symbol	Level	
		Coded	Uncoded
Day temperature (℃)	D	-1.68	26
		-1	28
		0	31
		1	33
		1.68	35
Night temperature (℃)	N	-1.68	21
		-1	23
		0	26
		1	28
		1.68	30
Light intensity (μmol m^{-2} s^{-1})	L	-1.68	80
		-1	125
		0	185
		1	225
		1.68	300

Ltd., England) 量取總葉面積後，予平均分組，放置於日/夜溫約為 32/27℃的溫室中馴化 1 wk 後，進行檢測。同一生長箱，5 株為 1 組置放於壓克力箱中，每次試驗前 1 天均充分給水。日夜溫設定分別為 28/23℃，植株最上位葉高度的光強度約 200 μmol m^{-2} s^{-1}，日夜週期為 12 h，相對濕度 70–90%，每 4 min 記錄 1 次數據，連續記錄擷取 7 d 淨二氧化碳交換量。

蝴蝶蘭種苗生理特性檢測之試驗

試驗材料為購自一心生技公司的蝴蝶蘭 *P.* Sogo Yukidian '1318'、世芥蘭業公司的 *P.* Sogo Plum 'F2486'、台大蘭園的 *P.* Taida Smile 'Taida Little Green' 及上品蘭園的 *P.* Nobby's 'Cat Nip'，皆為 3.5 吋盆成熟株。植株購入後，以葉面積儀 (AM-300, ADC Bio-Scientific Ltd., England) 量取總葉面積並平均分組，放置於日/夜溫約為 32/27℃的溫室中馴化 1 wk 後，分批進行檢測。

影響植物生理的因子繁多，考量商業溫室有效控制、檢測技術、時間與成本後，先選定日溫、夜溫及光強度為檢測條件，探討品種間最適環境條件組合。利用 Design-Expert 軟體 (V8.0.7.1, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA)，採用中央合成設計 (Central Composite Design; CCD) 組合試驗條件，試驗變數及位準設計如表 1 所列，日溫 (D) 設定高低限為 33 及 28℃，夜溫 (N) 設定高低限為 28 及 23℃，光強度 (L) 高低限為 225–125 μmol m^{-2} s^{-1}，設計後之試驗條件及組合如表 2 所列。本試驗探討日溫、夜溫及光強度對於蝴蝶蘭植株生育之影響，其中有 8 組複因子試驗點及 6 個軸上點，中心點採 4 重複，合計有 18 組試驗條件，每組試驗條件，以 5 株為 1 組置放於同一生長箱壓克力箱中，每次試驗前 1 天均充分給水。量測期間每 4 min 記錄 1 次數據，累計計算淨二氧化碳交換量，依 Long & Hällgren (1985, 1993) 方法計算單位葉面積之光合作用速率。

結果與討論

植株最適馴化及測量時間之條件

植株光合作用受環境影響為一動態過程，葉片會因外在環境變化而進行快速及動態的適應調整 (Calatayud *et al*. 2007)，為確定不同試驗條件之適應時間，本階段試驗旨在確認最適檢測時間及流程，連續測量 7 d 之淨 CO_2 交換量，結果如圖 2。試驗開始後 1–2 d，數據動態變化較大且有逐漸上升趨勢，第 3 天之後趨於穩定，直到第 7 天開始有下降趨勢。在試

表 2. 本研究之試驗設計及條件組合。

Table 2. The arrangement and responses of Central Composite Design.

Treatment	Coded			Variable		
	D	N	L	D (℃)	N (℃)	L (μmol m^{-2} s^{-1})
1	-1.68	0	0	26	26	185
2	-1	-1	-1	28	23	125
3	-1	-1	1	28	23	225
4	-1	1	-1	28	28	125
5	-1	1	1	28	28	225
6	0	-1.68	0	31	21	185
7	0	0	-1.68	31	26	80
8	0	0	0	31	26	185
9	0	0	0	31	26	185
10	0	0	0	31	26	185
11	0	0	0	31	26	185
12	0	0	1.68	31	26	300
13	0	1.68	0	31	30	185
14	1	-1	-1	33	23	125
15	1	-1	1	33	23	225
16	1	1	-1	33	28	125
17	1	1	1	33	28	225
18	1.68	0	0	35	26	185

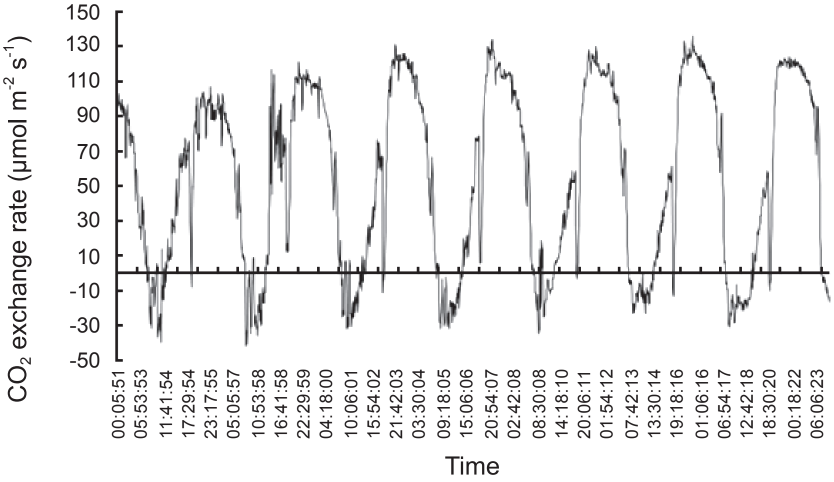

圖 2. 蝴蝶蘭 3.5 吋成熟株 *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘F1442’ 7 d 淨二氧化碳交換量。

Fig. 2. The net CO_2 exchange rate of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘F1442’ for 7 days.

驗初期的不穩定原因可能有二：其一是植株甫經環境條件變化，需要一段調整適應的時間，也必須要有完整的時間進行氣體交換 (He & Li 2014)，此亦為設計本階段試驗之原因；其二則源自於箱體內部的空氣組成問題，意即箱體本身所含空氣及人員於操作時造成的較高 CO_2

濃度，尚未由外界空氣完全置換，因此在初期必然有不正常的數值顯現。儘管此影響之存續時間不長 (視氣體流率而定)，但在此操作方式下必然存在，故即使在試驗條件設定與馴化溫室相同而沒有適應問題時，仍須保留一段馴化時間，惟此時間可視氣體流率、箱體大小等因素再作調整。

依前段所述，試驗期間愈長理應獲得更加穩定之數據。然而除了試驗時效、維護與運作的成本等現實面的考量，植株本身的狀況更該列為優先考慮。為求偵測氣體之準確性，試驗期間除抽氣線路外，箱體處於與外界隔絕的狀態，故試驗期間不能進行澆水管理，對於盆徑較小之植株或較高溫之試驗條件恐有缺水之疑慮。Cui *et al*. (2004) 即指出，缺水逆境的影響並不限於基本可知的蒸散作用、光合能力等方面，尚包括醣類代謝、自由基為害等層面。水分逆境對於二氧化碳交換作用型態有極顯著影響 (Chen & Lin 2012)，而維持植株之正常生理，當是試驗的首要條件，故選擇試驗時間時應作全面性的考量。

植物生長以光合作用為基礎，因此生理檢測著重在各環境條件下植株的光合作用能力變化，而光合作用可利用 CO_2 及碳水化合物等物質之變化來評估。考量分析的難易度，不必破壞性取樣且利於連續檢測的 CO_2 應是較理想的測定對象。Yao *et al*. (2011) 亦曾提出，CO_2 監測可作為研究蝴蝶蘭生理的方法，並可進一步作為決定栽培管理方式的重要依據。同時，CO_2 測定尚可一併監控試驗環境 (環境 CO_2 濃度亦是光合作用的影響因子) 是否正常，確認試驗是在穩定環境下進行，試驗結果即可歸因於植株之生理表現，有利於後續的分析討論。而由於蝴蝶蘭成株被認為是景天酸代謝 (crassulacean acid metabolism; CAM) 型植物 (Lo 2003)，光合作用效率相對較低，一般的測量方式不利於捕捉其細微的改變，因此擴大取樣範圍確有其必要。本試驗以生長箱及壓克力箱作為取樣的環境，即可將範圍由單葉擴大至全株甚至複數植株，有效放大 CAM 型植物的生理變化。

基於試驗開始後第 3 天數據即趨於穩定，且直到第 7 天始有下降趨勢，在考量長時間試驗所增加的成本、試驗時間過長將造成植株生長勢差異誤差及操作上的不便等因素後，決定將後續各組生理特性檢測試驗均固定連續測量 72 h，並擷取最後 24 h 淨二氧化碳交換量，據以計算光合作用速率。

蝴蝶蘭種苗生理特性檢測之試驗

影響植物生理變化的因子繁多，考量目前溫室可以有效控制的環境因子，本試驗選定日溫、夜溫及光強度為主要檢測因子，探討品種間最適環境條件組合。本試驗各參試品種之試驗數據，先經變方分析確認後，進行最適條件之推算分析與曲面圖之繪製。並依據試驗結果，推算最適公式，估計該品種可能最適合的生長環境條件 (表 3)。一心生技公司 *P.* Sogo Yukidian ‘1318’ 品種的變方分析結果如表 4，為一階模式 ($y = 27.24 - 0.19D - 0.62N + 1.69e^{-0.05} L$; $R^2 = 0.56$, $P < 0.05$)，推估最佳栽培環境條件為日夜溫約 28℃/23℃，光強度約 225 μmol m^{-2} s^{-1} (表 3)，屬於中日溫低夜溫高光照的品種，栽培實務上建議維持 28℃以上中至高日溫與高光度，並在不抽梗的前提下維持較低夜溫。在 3 個環境因子中，夜溫的影響力相對較大，因此較低夜溫有助於提高種苗品質。但是溫度 20–25℃時，蝴蝶蘭種苗生殖生長開始啟動 (Yoneda 2007)，將造成植株抽梗，若僅考慮降低夜溫有執行層面的困難。8 h 或更長的高日溫栽培，可以產生抑梗效果，即便在較低夜溫的環境之下也不會產生花梗 (Blanchard & Runkle 2006; Huang *et al*. 2008; Newton & Runkle 2009)。但反應曲面法無法準確估計範圍外的反應值，若因故須選擇範圍外的設定值，應特別留意其變化 (圖 3)。而光強度對於光合作用值的影響相當直接，為全面性地增減，隨著光強度降低，整體光合作用能力亦隨之下降，但反應曲面圖因其影響程度遠較為小而不會有明顯的變形。顯示在範圍內各種光強度下，溫度的影響趨勢均相同，因此不論光強度為何，溫度的操控原則基本上一致。由於本品種試驗得到的一階模式相關性較低 ($R^2 = 0.56$)，必須與業者實際栽培經驗進一步比對確認。

表 3. 以反應曲面法推算之蝴蝶蘭各品種最適條件設定值。

Table 3. The optimum conditions for each of *Phalaenopsis* cultivars predicted by the response surface methodology.

Cultivar	Day temperature (℃)	Night temperature (℃)	Light intensity (μmol m^{-2} s^{-1})
Phalaenopsis Sogo Yukidian '1318'	28.0	23.0	225
Phalaenopsis Sogo Plum 'F2486'	32.5	23.8	100
Phalaenopsis Taida Smile 'Taida Little Green'	33.0	27.5	225
Phalaenopsis Nobby's 'Cat Nip'	33.0	28.0	225

表 4. 反應曲面變方分析表 (*Phalaenopsis* Sogo Yukidian '1318')。

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) for response surface (*P.* Sogo Yukidian '1318').

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	*P*-value Prob > F	
Model	6.520E + 006	3	2.173E + 006	5.11	0.0166	significant
A-Day	6.761E + 005	1	6.761E + 005	1.59	0.2314	
B-Night	5.822E + 006	1	5.822E + 006	13.69	0.0030	
C-Light	22735.83	1	22735.83	0.05	0.8211	
Residual	5.104E + 006	12	4.253E + 005	-	-	
Lack of Fit	4.593E + 006	10	4.593E + 005	1.80	0.4098	not significant
Pure Error	5.109E + 005	2	2.554E + 005	-	-	
Cor Total	1.162E + 007	15	-	-	-	
R^2 = 0.56						

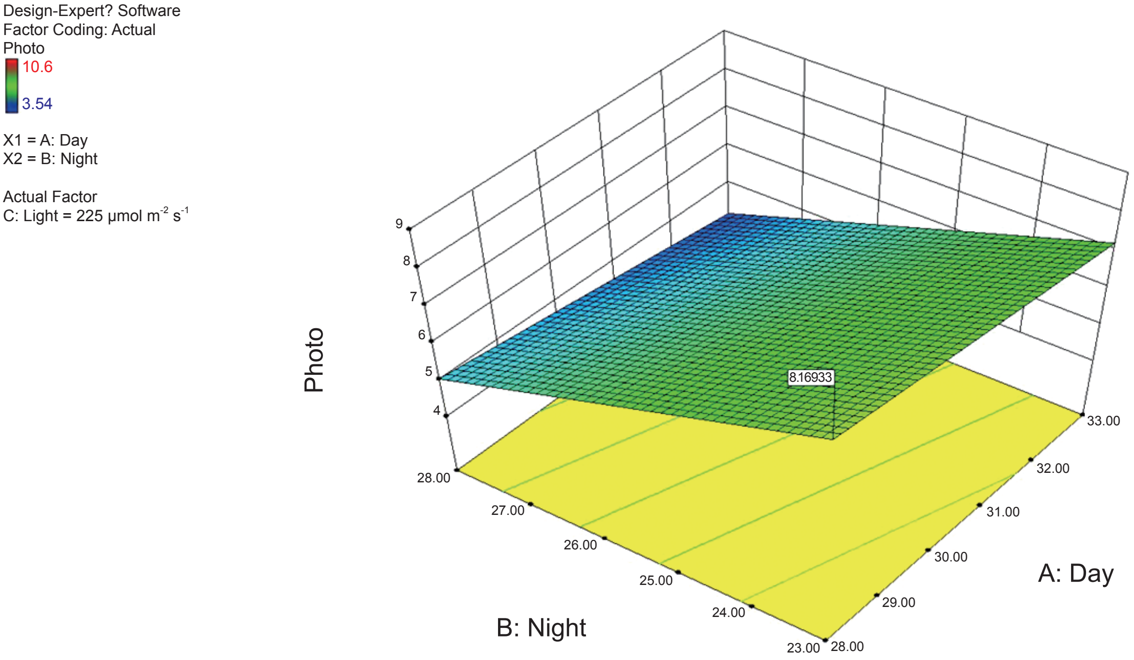

圖 3. 蝴蝶蘭生理檢測反應曲面圖 (*Phalaenopsis* Sogo Yukidian '1318')。

Fig. 3. Response surface plots plotted according to results of *P.* Sogo Yukidian '1318'.

世芥蘭業公司 *P.* Sogo Plum ‘F2486’ 品種的變方分析結果如表 5，為二階模式 ($y = -247.35 + 10.76D + 5.84N + 3.24e^{-0.03}\ L - 0.03DN - 1.15e^{-0.04}\ DL - 0.14D^2 - 0.10N^2$; $R^2 = 0.72$, $P < 0.05$)，推估最佳栽培環境條件為日夜溫約 32.5℃/24℃，光強度約 100 μmol m^{-2} s^{-1} (表 3) ，屬於日夜溫差大且光照影響程度相對較低的組合 (圖 4)，對此品種日夜保持恆溫即為不利的條件。與前者不同的是，其圖形曲率較大，因子間的交感也有影響，故日溫與夜溫的組合方式更顯複雜，在不同的溫度範圍下，調整溫度的影響截然不同。當日溫較高 (例如 32.5℃)，提高夜溫 (例如自 24℃提高至 26℃) 光合作用值將明顯下降，但日溫較低 (例如 28.5℃) 時，夜溫的變化對於光合作用較無明顯影響。故若欲依設施狀況調整溫度，須經過較全面性的評估。而此品種所求得的極值與其餘三者不同，條件範圍內已出現曲面的頂點，表示此值極可能已逼近真實的極值。隨著光強度增加，極值將逐漸往低日溫方向移動，此意謂高日溫與高光照同時存在不利於此品種，此時應優先減少光照並維持高日溫，於栽培時須格外留意。此外，由於極值的偏移，高日夜溫的組合也失去其優勢，成為與日夜恆溫相似的不利條件，故選擇條件時，若設施不能提供穩定的條件，則應留意環境變動可能帶來對植株生育的影響。

台大蘭園 *P.* Taida Smile ‘Taida Little Green’ 品種的變方分析結果如表 6，為二階模式 ($y = 57.30 - 1.80D - 1.76N - 1.03e^{-0.03}\ L + 0.15DN + 6.57e^{-0.06}\ DL + 2.50e^{-0.05}\ NL - 0.03D^2 - 0.06N^2 + 7.27e^{-0.09}\ L^2$; $R^2 = 0.87$, $P < 0.05$)，推估最佳栽培環境條件為日/夜溫約 33℃/27.5℃，且光強度約 225 μmol m^{-2} s^{-1} (表 3)，為高日夜溫的類型 (圖 5)。低日、夜溫並非最不利的條件，且隨著光強度降低，兩者的光合作用值也會逐漸拉近，而另外兩者端點之表現則變化不大。此現象顯示該品種對於日、夜溫的需求可能不在於值的絕對高低，而是溫差的恆定，若欲調整溫度的設定，應留意此要件。

上品蘭園 *P.* Nobby’s ‘Cat Nip’ 品種的變方分析結果如表 7，為二階模式 ($y = 56.11 + 2.67D - 5.53N - 3.70e^{-0.03}\ L + 0.07DN + 1.27e^{-0.05}\ DL + 8.63e^{-0.05}\ NL - 0.07D^2 - 0.04N^2 + 3.88e^{-0.08}\ L^2$; $R^2 = 0.89$, $P < 0.05$)，推估最佳栽培環境條件為日/夜溫約 33℃/28℃，且光強度約 225 μmol m^{-2} s^{-1} (表 3)，與前者同屬高日夜溫的類型 (圖 6)。雖然與其相對的低日、夜溫條件下光合作用表現不佳，但隨著光強度降低，高夜溫的優勢會逐漸被扭轉，但高日溫的優勢並不會有明顯改變。故在栽培時，應以高日溫的條件為優先考量，夜溫及光照則應互相搭配著作調整。

本試驗若採傳統複因子試驗，3 變數 5 層級便需要 125 個試驗組合，每個試驗條件連續檢測 3 d，檢測流程便長達 1 年以上，即便使用多組生長箱設計，試驗時程顯然無法符合實際需求，隨試驗時間的變化，植物的生長也造成生物誤差，實有必要發展減少試驗次數的檢測方法。尋求最佳化條件的時候，傳統的逐次檢驗試驗因子非常耗時，還必須考慮到因子之間的交感作用 (Chandrika & Shahidi 2005)。

由於反應曲面試驗設計法的靈活與可變性，近年來已廣泛地應用於尋求獲取最佳品質的最適操作條件上，反應曲面法具有下列優點：(1) 減少試驗次數，即減少成本及時間，在條件因子愈多時，效果愈顯著；(2) 可同時探討數個因子，及因子間的交互影響，並可知悉各因子對反應值的貢獻程度；(3) 藉由曲面圖，可快速得知最適化條件。其原理是利用試驗設計來進行有系統的條件挑選，再依控制條件 (自變數 x) 與反應值 (依變數 y) 來建立關係函數 $y = f(x1, x2, \cdots, xn) + \varepsilon$ (ε 為反應值的誤差)，藉由函數在一定條件範圍內預測出來的結果，繪製成反應曲面圖協助判斷最適條件的範圍 (Liu & Peng 2002; Su 2005)。

欲使用反應曲面法，須先符合以下要件：(1) 控制條件與反應結果必須是連續型量變數，(2) 控制條件至少 2 個。在本試驗中，控制條件有三：日溫、夜溫及光強度，三者連同反應結果-光合作用速率皆是連續型量變數，故反應曲面法之應用理論上並無疑義。但農業畢竟有別於化學工業等精密科技，因此在使用

表 5. 反應曲面線性模組的變方分析表 (*Phalaenopsis* Sogo Plum ‘F2486’)。

Table 5. Analysis of variance (ANOVA) for response surface (*P.* Sogo Plum ‘F2486’).

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	*P*-value Prob > F	
Model	3.576E + 006	7	5.108E + 005	3.38	0.0465	significant
A-Day	8.893E + 005	1	8.893E + 005	5.89	0.0382	
B-Night	6.786E + 005	1	6.786E + 005	4.49	0.0631	
C-Light	3.845E + 005	1	3.845E + 005	2.54	0.1451	
AB	48360.50	1	48360.50	0.32	0.5854	
AC	3.436E + 005	1	3.436E + 005	2.27	0.1658	
A2	1.175E + 006	1	1.175E + 006	7.77	0.0211	
B2	5.953E + 005	1	5.953E + 005	3.94	0.0784	
Residual	1.360E + 006	9	1.511E + 005	-	-	
Lack of Fit	9.473E + 005	6	1.579E + 005	1.15	0.4937	not significant
Pure Error	4.125E + 005	3	1.375E + 005	-	-	
Cor Total	4.936E + 006	16	-	-	-	
$R^2 = 0.72$						

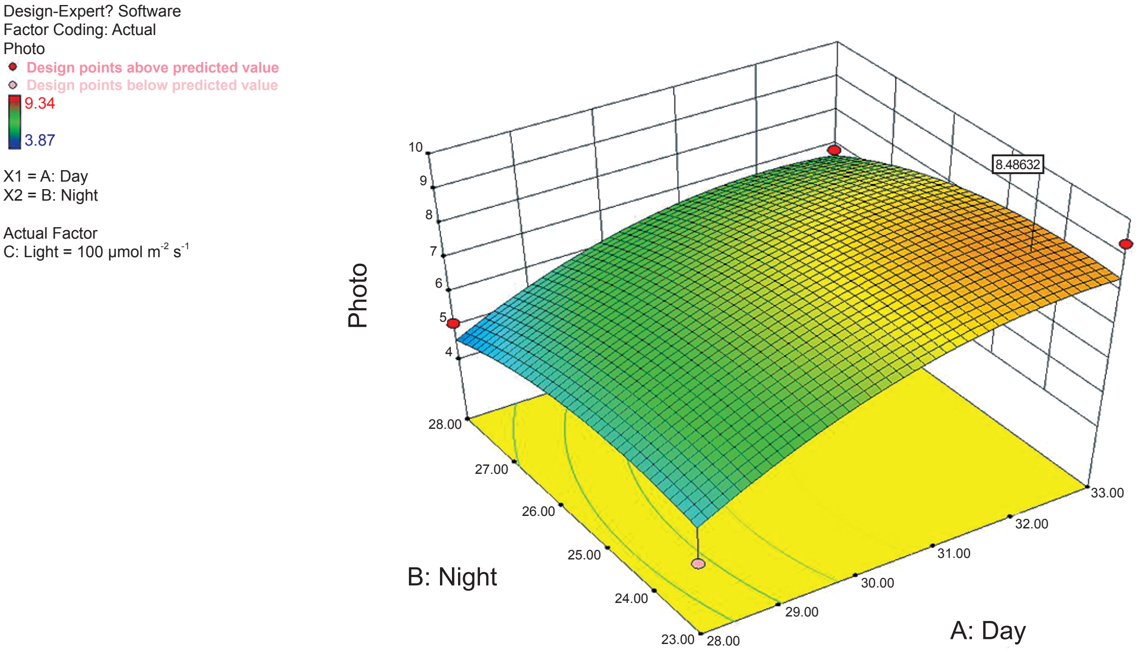

圖 4. 蝴蝶蘭生理檢測反應曲面圖 (*Phalaenopsis* Sogo Plum ‘F2486’)。

Fig. 4. Response surface plots plotted according to results of *P.* Sogo Plum ‘F2486’.

上略有不同。通常做法是先選定一條件範圍後，建立一階模型 (first-order model)，經由試驗確認此範圍內是否存在顯著的曲率。若不存在，則循最陡坡度法 (method of steepest descent or ascent) 尋找下一個範圍重做。若具有顯著曲率，即表示範圍內存在極值，此時可配置二階模型 (second-order model) 來尋找。求得極值後，亦可再進行試驗確認，此時即可

表 6. 反應曲面線性模組的變方分析表 (*Phalaenopsis* Taida Smile 'Taida Little Green')。

Table 6. Analysis of variance (ANOVA) for response surface (*P.* Taida Smile 'Taida Little Green').

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	*P*-value Prob > F	
Model	1.326E + 006	9	1.473E + 005	4.31	0.0446	significant
A-Day	2.182E + 005	1	2.182E + 005	6.38	0.0449	
B-Night	1643.38	1	1643.38	0.048	0.8337	
C-Light	6426.26	1	6426.26	0.19	0.6797	
AB	6.994E + 005	1	6.994E + 005	20.47	0.0040	
AC	5160.27	1	5160.27	0.15	0.7110	
BC	72892.20	1	72892.20	2.13	0.1944	
A2	64589.30	1	64589.30	1.89	0.2183	
B2	2.300E + 005	1	2.300E + 005	6.73	0.0410	
C2	47058.29	1	47058.29	1.38	0.2851	
Residual	2.050E + 005	6	34172.03	-	-	
Lack of Fit	1.897E + 005	4	47425.91	6.19	0.1439	not significant
Pure Error	15328.52	2	7664.26	-	-	
Cor Total	1.531E + 006	15	-	-	-	
R^2 = 0.87						

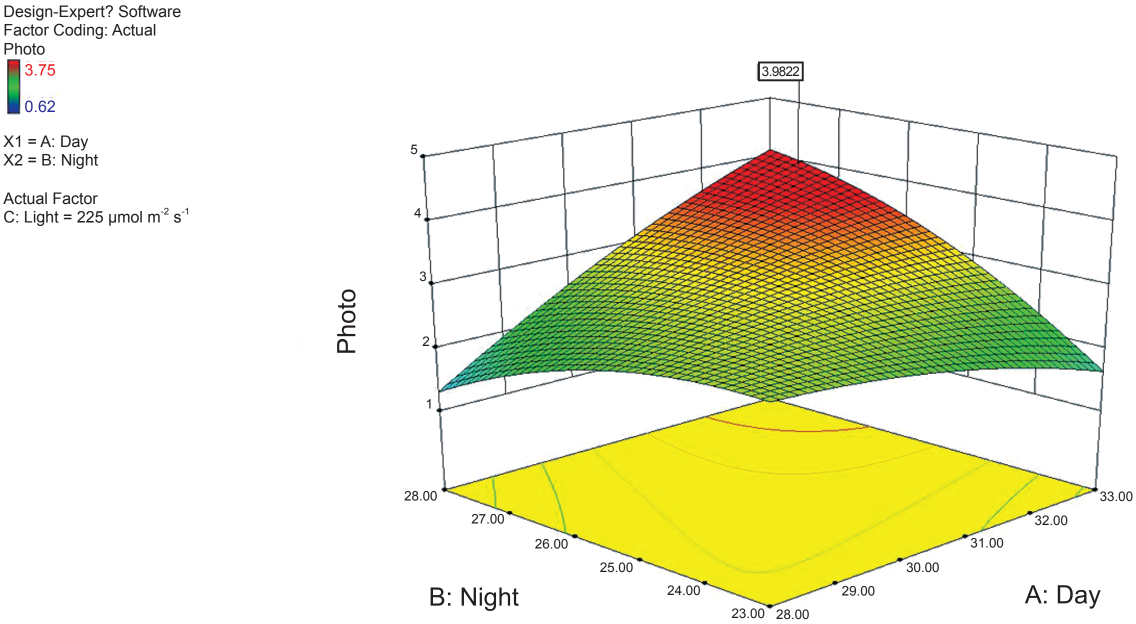

圖 5. 蝴蝶蘭生理檢測反應曲面圖 (*Phalaenopsis* Taida Smile 'Taida Little Green')。

Fig. 5. Response surface plots plotted according to results of *P.* Taida Smile 'Taida Little Green'.

獲得最佳解及其控制條件 (Su 2005; Wu 2008; Chiu *et al*. 2013)。但若依上述方法求解，可能會得到無法在實際栽培環境中應用的條件，畢竟環境條件的調整尚須考量當地氣候、硬體設施能量、提升的收益與成本之平衡及設施中其它植株的需求等因素。因此，本試驗應用方

表 7. 反應曲面線性模組的變方分析表 (*Phalaenopsis* Nobby's 'Cat Nip')。

Table 7. Analysis of variance (ANOVA) for response surface (*P.* Nobby's 'Cat Nip').

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	*P*-value Prob > F	
Model	7.751E + 006	9	8.612E + 005	5.12	0.0300	significant
A-Day	7.320E + 005	1	7.320E + 005	4.35	0.0821	
B-Night	3231.37	1	3231.37	0.019	0.8943	
C-Light	34321.39	1	34321.39	0.20	0.6674	
AB	2.389E + 005	1	2.389E + 005	1.42	0.2785	
AC	34186.13	1	34186.13	0.20	0.6681	
BC	1.543E + 006	1	1.543E + 006	9.17	0.0232	
A^2	3.494E + 005	1	3.494E + 005	2.08	0.1997	
B^2	2.023E + 005	1	2.023E + 005	1.20	0.3150	
C^2	2.512E + 006	1	2.512E + 006	14.92	0.0083	
Residual	1.010E + 006	6	1.683E + 005	-	-	
Lack of Fit	1.822E + 005	3	60749.67	0.22	0.8771	not significant
Pure Error	8.277E + 005	3	2.759E + 005	-	-	
Cor Total	8.761E + 006	15	-	-	-	
$R^2 = 0.89$						

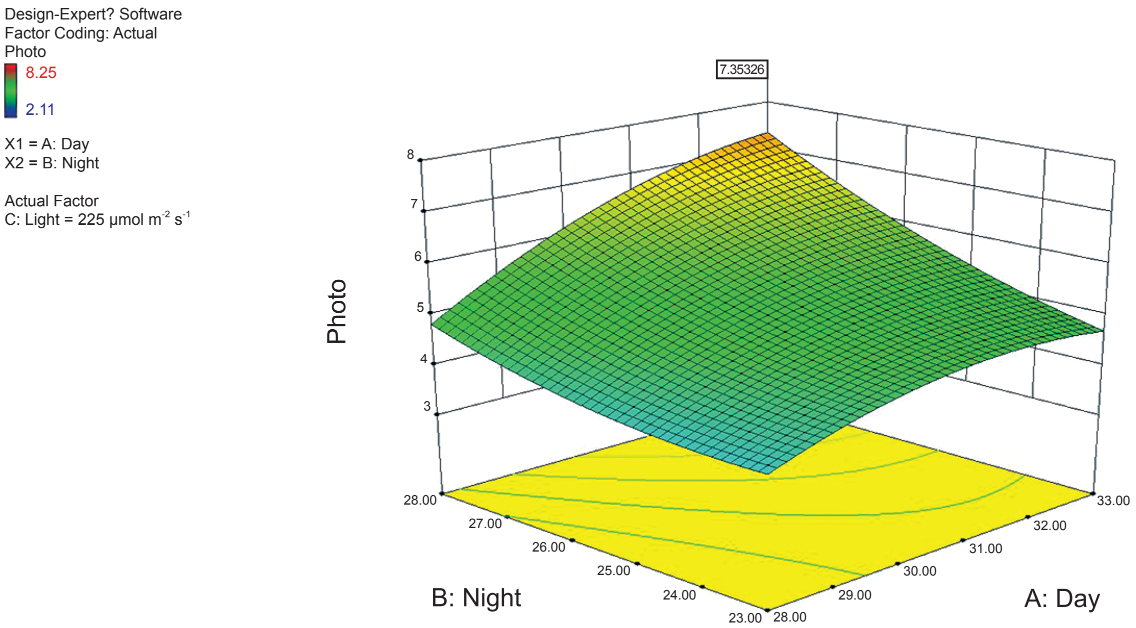

圖 6. 蝴蝶蘭生理檢測反應曲面圖 (*Phalaenopsis* Nobby's 'Cat Nip')。

Fig. 6. Response surface plots plotted according to results of *P.* Nobby's 'Cat Nip'.

式略做修改，先行參考業界設施使用狀況以制定條件範圍，由此尋找範圍內局部最佳解，不再修正條件範圍以尋找真實的極值。

結論

蝴蝶蘭 *P.* Sogo Yukidian '1318'、*P.* Sogo

Plum ‘F2486’、*P.* Taida Smile ‘Taida Little Green’ 及 *P.* Nobby’s ‘Cat Nip’ 等 4 個品種系營養生長期之預估最適日夜溫條件分別為 28℃/23℃、33℃/24℃、33℃/27℃及 33℃/28℃；預估最適光強度除 ‘F2486’ 為 100 μmol m^{-2} s^{-1} 外，其餘均為 225 μmol m^{-2} s^{-1}。本試驗結果顯示，4 個蝴蝶蘭品種之生理特性不盡相同，也初步可以確認此試驗方法能區分不同品種的種苗生理特性，而反應曲面圖所呈現的特性趨勢，配合業者驗證之後，可以提供栽培管理調整時的參考依據。但本試驗是以生長箱模擬控制進行，日夜溫及光環境與實際自然及溫室環境並不完全相同，因此儘管試驗的結果可以推估可能的理想條件設定值，但仍必須持續進行試驗，同時配合業者實際栽培觀察反覆驗證，以累積足夠的檢測經驗及品種特性數據。

引用文獻

Akers, C. P., S. W. Akers, and C. A. Mitchell. 1985. The minitron system for growth of small plant under controlled environment conditions. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110:353–357.

Blanchard, M. G. and E. S. Runkle. 2006. Temperature during the day, but not during the night, controls flowering of *Phalaenopsis* orchids. J. Exp. Bot. 57:4043–4049.

Calatayud, A., D. Roca, E. Gorbe, and P. F. Martínez. 2007. Light acclimation in rose (*Rosa hybrida* cv. Grand Gala) leaves after pruning: Effects on chlorophyll a fluorescence, nitrate reductase, ammonium and carbohydrates. Sci. Hort. Amsterdam 111:152–159.

Chandrika, L. P. and F. Shahidi. 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. Food Chem. 93:47–56.

Chen, C. C. and R. S. Lin. 2012. CO2 uptake patterns in *Phalaenopsis amabilis*. Afr. J. Agric. Res. 7:128–141.

Chen, H. M., F. B. Lu, G. F. Zhu, J. X. Cao, Y. You, and W. F. Xiao. 2012. The planting performance of 17 *Phalaenopsis* varieties in Guangzhou and Linzhi. Agric. Sci. Guangdong 19:48–50. (in Chinese with English abstract)

Chen, J. J. and J. C. Peng. 1996. The study of extrudate’s physical properties with response surface methodology. J. Agric. Mach. 5(3):29–39. (in Chinese with English abstract)

Chiang, M. N. 1983. Studies on the method of estimating rates of photosynthesis and photorespiration in horticultural crops. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 29:189–203. (in Chinese with English abstract)

Chiu, H. W., J. C. Peng, S. J. Tsai, J. R. Tsay, and W. B. Lui. 2013. Process optimization by response surface methodology and characteristics investigation of corn extrudate fortified with Yam (*Dioscorea alata* L.). Food Bioprocess Tech. 6:1494–1504.

Christenson, E. A. 2001. Phalaenopsis: A Monograph. Timber Press. Portland Oregon. 330 pp.

Cui, Y. Y., D. M. Pandey, E. J. Hahn, and K. Y. Paek. 2004. Effect of drought on physiological aspects of crassulacean acid metabolism in *Doritaenopsis*. Plant Sci. 167:1219–1226.

Customs Administration, Ministry of Finance. 2013. https://portal.sw.nat.gov.tw /APGA/GA01 (visit on 9/25/2014)

Day, T. E. 1991. Fundamental Studies on Photosynthesis Characteristics of Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). Master Thesis, Department of Horticulture, National Taiwan University. Taipei. 103 pp. (in Chinese with English abstract)

He, M. H. and K. T. Li. 2014. The plastic tunnel system reduced irradiance, and whole plant photosynthesis and vegetative growth in strawberry cultivation. J. Taiwan Soc. Hort. Sci. 60:41–49. (in Chinese with English abstract)

Hsu, M. F. and W. L. Hong. 2005. Study on yam spread processing by response surface methodology. Bull. TDARES 58:27–43. (in Chinese with English abstract)

Huang, C. H., H. S. Hsuan, S. H. Huang, and K. L. Huang. 2008. Effect of different day/night temperatures on flower-stalk emergence inhibition and flowering of *Phalaenopsis* hybrids. J. Taiwan Soc. Hort. Sci. 54:11–23. (in Chinese with English abstract)

Klingeman, W. E., M. W. van Iersel, J. G. Kang, R. M. Auge, J. L. Moore, and P. C. Flanagan. 2005. Whole-plant gas exchange measurements of mycorrhizal “Iceberg” roses exposed to cyclic drought. Crop Prot. 24:309–317.

Knight, S. L., C. P. Akers, S. W. Akers, and C. A. Mitchell. 1988. Minitron II system for precise control of the plant growth environment. Photosynthetica 22:90–98.

Lin, T. P. 1988. Native Orchids of Taiwan Vol. 2. Southern Materials Center. Taipei. 355 pp. (in Chinese)

Liu, M. C. and J. C. Peng. 2002. The study on the optimum operation conditions of tea roasting machine by using response surface methodology. J. Agric. Mach. 11:45–56. (in Chinese with English abstract)

Lo, S. C. 2003. Identification of Taiwan Native Phalaenopsis and Photosynthetic Characteristics. Doctoral Dissertation, Department of Life Science, National Chung Hsing University. Taichung. 120 pp. (in Chinese with English abstract)

Long, S. P. and J. E. Hällgren. 1985. Measurement of CO_2 assimilation by plants in the field and the laboratory. p.62–94. *in*: Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis (Coombs, J., D. O. Hall, S. P. Long, and J. M. O. Scurlock, eds.) Pergamon Press. Oxford. 298 pp.

Long, S. P. and J. E. Hällgren. 1993. Measurement of CO_2 assimilation by plants in the field and the laboratory. p.129–167. *in*: Photosynthesis and Production in A Changing Environment: A Field and Laboratory Manual (Hall, D. O., J. M. O. Scurlock, H. R. Bolhàr-Nordenkampf, R. C. Leegood, and S. P. Long, eds.) Chapman and Hall. London. 464 pp.

Miller, D. P., G. S. Howell, and J. A. Flore. 1996. A whole-plant, open, gas-exchange system for measuring net photosynthesis of potted woody plants. HortScience 31:944–946.

Newton, L. A. and E. S. Runkle. 2009. High-temperature inhibition of flowering of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* orchids. HortScience 44:1271–1276.

Shen, Z. G., C. Q. Chen, L. L. Wang, B. Jiang, and H. F. Lu. 2010. Photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics of three *Dendrobium* Species. Acta Bot. Boreal. Occident. Sin. 30:2067–2073. (in Chinese with English abstract)

Su, S. K. 2005. The Application of Response Surface Design on the Complex Network. Master Thesis, Graduate Institute of Statistics, National Central University. Taoyuan. 37 pp. (in Chinese with English abstract)

Tsai, W. T. and C. Y. Chu. 2001. The industry of *Phalaenopsis* in Taiwan. Horticulture NCHU. 26:27–42. (in Chinese with English abstract)

van Iersel, M. W. and B. Bugbee. 2000. A multiple chamber, semicontinuous, crop carbon dioxide exchange system: design, calibration, and data interpretation. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 125:86–92.

Weng, J. H. and C. Y. Chen. 1982. The research on the characteristics of photosynthesis and material production of soybean. J. Sci. & Eng. NCHU. 19:147–153. (in Chinese with English abstract)

Wu, C. L. 2008. Study on the Optimal Operation Conditions of Pulping and Hulling Machine for Coffee Beans. Master Thesis, Department of Biomechatronic Engineering, National Chiayi University. Chiayi. 108 pp. (in Chinese with English abstract)

Yao, M. H., C. J. Chen, and G. S. Huang. 2011. Estimating optimum temperature and light intensity for orchid of *phalaenopsis* from the measurements of carbon dioxide flux and daily carbon balance. Crop Environ. Bioinform. 8:172–180. (in Chinese with English abstract)

Yoneda, K. 2007. Phalaenopsis. Agricultural Extension Center, National Chung Hsing University. Taichung. 180 pp.

Determination of Physiological Parameters of *Phalaenopsis* Cultivars by Using Response Surface Methodology

Jian-Cheng Ciou[1], Ting-Fang Hsieh[2], Jyh-Rong Tsay[3], and Ting-En Dai[4,*]

Abstract

Ciou, J. C., T. F. Hsieh, J. R. Tsay, and T. E. Dai. 2015. Determination of physiological parameters of *Phalaenopsis* cultivars by using response surface methodology. J. Taiwan Agric. Res. 64(2):122–134.

Phalaenopsis is one of the important export floricultural crops in Taiwan. It is mainly exported to the United States, Japan and the Netherlands. However, the primary factor accounting for the quality of seedlings has not been fully understood so that the physiological characteristics for its quality are not clear. Thus, no standards can be set up for an optimal growth conditions for the cultivated cultivars by growers. Attempt has been made for this study to develop a detection technique for examining the physiological characteristics of several *Phalaenopsis* cultivars and to use it as a service platform. With such, a better understanding of the optimal growth conditions, such as day and night temperatures and light intensity, in the vegetative and spike-forcing phases of *Phalaenopsis* plants can be reached. The information is needed to improve cultural practices for domestic production as well as to provide a reference management for countries that import these orchids. To reduce time and frequency for the examination, this study also designed a continuous carbon dioxide exchange system with multiple chambers for whole plants measurements by incorporating the response surface methodology. For cultivars of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian '1318', *P.* Sogo Plum 'F2486', *P.* Taida Smile 'Taida Little Green' and *P.* Nobby's 'Cat Nip', the estimated optimal day and night temperatures were 28℃/23℃, 33℃/24℃, 33℃/27℃, and 33℃/28℃, respectively. The estimated optimum light intensity for cultivar *P.* Sogo Plum 'F2486' was about 100 μmol m^{-2} s^{-1}, and for the rest of cultivars was about 225 μmol m^{-2} s^{-1}. All these experimental data will be provided to growers for verification. Due to the differences between the simulated growth chamber and the natural or greenhouse cultivation environment in other countries, as well as batch tests caused by equipment limitation and the uniformity of plants, the developed measurement technique needs to be further improved and verified in the future.

Key words: Photosynthesis, Whole-plant measurement, Variety characteristics, Response surface methodology.

Received: October 16, 2014; Accepted: December 19, 2014.

* Corresponding author, e-mail: tedai@tari.gov.tw
1 Research Assistant, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yunlin, Taiwan, ROC.
2 Research Fellow and Director, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yunlin, Taiwan, ROC.
3 Research Fellow and Deputy Director General, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
4 Research Fellow and Department Head, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yunlin, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(2):135–144 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06402.06 研究報告

檢測銀葉粉蝨體內南瓜捲葉病毒 (*Squash leaf curl Philippines virus*) 專一性引子開發

鄭櫻慧 [1] 林漢釗 [2] 林鳳琪 [3,*]

摘要

鄭櫻慧、林漢釗、林鳳琪。2015。檢測銀葉粉蝨體內南瓜捲葉病毒 (*Squash leaf curl Philippines virus*) 專一性引子開發。台灣農業研究 64(2):135–144。

以銀葉粉蝨 (*Bemisia argentifolii* Bellows & Perring) 為媒介所傳播的南瓜捲葉病毒 (*Squash leaf curl Philippines virus*, SLCPHV)，係近年來在台灣中南部瓜類上常見的病毒病害，造成農民嚴重的損失。除了此病毒外，銀葉粉蝨尚可傳播其他的豆類金黃嵌紋病毒屬 (*Begomovirus*) 的病毒。因此，必須開發比原有簡併式 CP1up/dw 更具專一性的引子對，以提高在田間進行南瓜捲葉病毒病害監測及銀葉粉蝨體內帶毒率偵測的準確度。本試驗利用滾環式擴增法擴增 SLCPHV 及 3 種田間常見的豆類金黃嵌紋病毒屬病毒番茄捲葉新德里病毒 (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV)、藿香薊葉脈黃化病毒 (*Ageratum yellow vein virus*) 及木瓜捲葉廣東病毒 (*Papaya leaf curl Guangdong virus*)，以 *Bam* HI 進行酶切，經選殖、定序、比對後，設計出可針對 SLCPHV 的專一性引子對 SLCVup/dw，並在田間常見的 8 種瓜類作物與銀葉粉蝨蟲體上進行測試。結果顯示，使用專一性引子對 SLCVup/dw 只會偵測到感染瓜類的 SLCPHV 或 ToLCNDV，以其檢測結果估算田間帶毒粉蝨之族群密度逐漸增加，與洋香瓜罹病率逐漸升高之趨勢相符。相較於簡併式引子對，顯示此專一性引子對具有更好的靈敏度及準確度，未來可應用於田間病害偵測及帶毒銀葉粉蝨之監測。

關鍵詞：銀葉粉蝨、南瓜捲葉病毒、瓜類、引子。

前言

南瓜捲葉病毒 (*Squash leaf curl Philippines virus*, SLCPHV) 屬於雙生病毒科 (Geminiviridae) 中的豆類金黃嵌紋病毒屬 (*Begomovirus*)。Geminiviridae 的基因體為環狀單股的 DNA (circular ssDNA)，基因體大小為 2.7–3.0 kb。根據 Geminiviridae 的基因體結構、寄主範圍及媒介昆蟲等可分為 4 個病毒屬：*Mastrevirus*、*Curtovirus*、*Topocuvirus* 和 *Begomovirus*，其中以粉蝨傳播的 *Begomovirus* 為最大的一群，已超過 180 種病毒，具有高度的經濟重要性 (Fauquet *et al*. 2008)。在國內發生的紀錄包括番茄捲葉台灣病毒 (*Tomato leaf curl Taiwan virus*; ToLCTWV)、番茄捲葉新竹病毒 (*Tomato leaf curl Hsinchu virus*; ToLCHsV)、番茄黃化捲葉泰國病毒 (*Tomato yellow leaf curl Thailand virus*; TYLCTHV)、藿香薊葉脈黃化花蓮病毒 (*Ageratum yellow vein Hualien virus*; AYVHuV) (Jan *et al*. 2007; Tsai *et al*. 2011)、番茄捲葉新德里病毒 (*Tomato leaf curl New Delhi virus*; ToLCNDV) (Chang *et al*. 2010)、南瓜捲葉菲律賓病毒 (*Squash leaf curl Philippines virus*; SLCPHV) (Liao *et al*. 2007; Tsai *et al*. 2007)、甘藷捲葉病毒 (*Sweet potato leaf curl virus*; SPLCV) (Chung *et al*. 1985)、

投稿日期：2014 年 8 月 7 日；接受日期：2014 年 12 月 29 日。
* 通訊作者：fclin@tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
2 農委會農業試驗所應用動物組研究助理。台灣 台中市。
3 農委會農業試驗所應用動物組副研究員。台灣 台中市。

藿香薊葉脈黃化病毒 (*Ageratum yellow vein virus*; AYVV) (Wu *et al*. 2008)、聖誕紅捲葉病毒 (*Poinsettia leaf curl virus*; PLCV) (Tsai *et al*. 1997)、木瓜捲葉廣東病毒 (*Papaya leaf curl Guangdong virus*; PaLCuGDV) (Chang *et al*. 2003) 等。在台灣曾有新德里番茄捲葉病毒 (ToLCNDV) 感染東方型甜瓜的紀錄，但感染洋香瓜等高經濟價值葫蘆科作物仍以 SLCPHV 為主 (Lin *et al*. 2011)。

銀葉粉蝨 (*Bemisia argentifolii* Bellows & Perring) 為害農作物的情形相當嚴重，除了吸取作物汁液，造成葉片產生斑點、黃化、萎凋及提早落葉等徵狀；在害蟲大量發生時，因其分泌之蜜露排泄在作物上，導致煤煙病發生，阻礙葉片行光合作用，進而使植株衰弱、產量減少、降低商品價值等等，造成嚴重經濟損失 (Lin *et al*. 1997)。此外，銀葉粉蝨為多種植物病毒病害的媒介昆蟲，經由其傳播可造成約 40 多種蔬菜及纖維作物等雙子葉植物感染雙生病毒科病毒 (Jones 2003)。

瓜類作物是台灣重要的蔬果作物，常見瓜類作物有西瓜、洋香瓜、香瓜、胡瓜、苦瓜、冬瓜等。根據 2009 年農委會農業統計年報，瓜類作物的栽培面積約為 22,984 ha。瓜類作物在生長期間極易遭受到病毒病害感染，在台灣約有 16 種病毒可感染瓜類作物，其中由銀葉粉蝨傳播 *Begomovirus* 屬的 SLCPHV，幾乎可感染所有的瓜類作物且造成經濟損失 (Deng 2011)。2008 年在台南地區的洋香瓜，因該病毒的感染甚而導致全園廢耕的情形。該病毒的分布，主要於中部的彰化縣、雲林縣二崙鄉、崙背鄉，及南部的台南市的東山區、將軍區、七股區、佳里區、安南區等栽培地區都有發現 SLCPHV 的感染紀錄。在 SLCPHV 病害防治上，以傳播媒介棲群密度及帶毒率監控為首要工作項目。

由於粉蝨為許多植物病毒的傳播媒介，也是多種 *Begomovirus* 屬病毒的媒介昆蟲。以簡併式引子對 CP1up/dw 在田間粉蝨帶毒率偵測，易有誤判其帶毒率的情形，因此開發針對偵測 SLCPHV 之高專一性引子對，提高偵測粉蝨帶毒率準確度，實屬必要。

材料與方法

供試帶病植株來源

自台灣中南部及東部等地區，採集罹患有雙生病毒之植株作物，包括番茄 (*Solanumlycopersicum* L.)、紫花藿香薊 (*Ageratum houstonianum* Mill.)、聖誕紅 (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) 及洋香瓜 (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Naud.)、西瓜 [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai.]、甜瓜 (*Cucumis melo* L. var. *makuwa* Makino)、哈密瓜 (*Cucumis melo* L. var. *saccharinus*)、扁蒲 (*Langenaria siceraria* Standl.)、南瓜 [*Cucurbita moschata* (Duchesne) Poir]、胡瓜 (*Cucumis sativus* L.)、冬瓜 (*Beninecasa hispida* Thunb.) 等瓜類作物 (表 1)。

植物組織及粉蝨蟲體 DNA 之萃取

在本試驗中的帶病毒植株，切取其罹病葉片組織約 100 mg，以 Plant Genomic DNA Purification Kit (GENEMARK Technology, Taiwan) 萃取植物的 DNA。在粉蝨蟲體部分，以黃色黏板捕捉已刺吸取食罹病毒株之粉蝨，再以蟲針挑取單隻粉蝨，利用 EDNA HiSpEx Tissue Kit (Saturn Biotech, Perth, Western Australia) 萃取單一蟲體的 DNA。

病毒基因體分析

雙生病毒基因體利用滾環式擴增法 (Rolling Circle Amplification; RCA) (Inoue-Nagata *et al*. 2004) 增幅，以供試植株 DNA 1.25 μL 作為板模，加入引子 (5’-GGTAATATTA-3’) 2.5 μL，10× buffer 2.5 μL，無菌水 15.5 μL，95℃反應 3 min，放至 4℃冷卻 10 min 後加入 dNTP 1.25 μL 與 Phi29 (0.1 μg $μL^{-1}$) (RepliPHI™ phi29 Reagent Set, EPICENTRE) 2 μL，於 30℃反應 18 h，反應完之產物再以 65℃處理 10 min 終止反應。RCA 產物以 BamHI 或 HindIII 酶切，選殖至以 BamHI 或 HindIII 處理之 pBluescript SK(-) 載體，所得之選殖株委託明欣生物科技有限公司 (台北，台灣) 進行定序分析。

表 1. 供試豆類黃金嵌紋病毒屬病毒感染之植物。

Table 1. Plant samples showing symptoms of virus infection used to detect begomoviruses by PCR.

Host plant	Scientific name	Virus species (abbreviation)	Symptom[z]
Tomato	*Lycopersicum esculentum* L.	*Tomato yellow leaf curl Thailant virus* (TYLCTHV)	LCY
		Tomato leaf curl Taiwan virus (ToLCTWV)	LCY
Ageratum	*Ageratum houstonianum* Mill.	*Ageratum yellow vein virus* (AYVV)	YV
Poinsettia	*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch	*Papaya leaf curl GuanDong virus* (PaLCGDV)	LYS
Melon	*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Naud	*Squash leaf curl Philippines virus* (SLCPHV)	LYS
Cantaloupe	*Cucumis melo* L. var. *saccharinus*	*Squash leaf curl Philippines virus* (SLCPHV)	LYS
Orient melon	*Cucumis melo* L. var. makuwa Makino	*Squash leaf curl Philippines virus* (SLCPHV)	MLY
Watermelon	*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai	*Squash leaf curl Philippines virus* (SLCPHV)	MLY
Bottle gourd	*Langenaria siceraria* Standl.	*Squash leaf curl Philippines virus* (SLCPHV)	SLCM
Pumpkin	*Cucurbita moschata* (Duchesne) Poir	*Squash leaf curl Philippines virus* (SLCPHV)	SLCM
Cucumber	*Cucumis sativus* L.	*Squash leaf curl Philippines virus* (SLCPHV)	MLY
Wax gourd	*Benincasa hispida* Thunb.	*Squash leaf curl Philippines virus* (SLCPHV)	SLCM

[z] LCY: leaf curl and yellowing; YV: vein yellowing; LYS: leaf yellowing and stunting; MLY: mild leaf yellowing; SLCM: severe leaf curl and mosaic.

引子之設計與聚合酶連鎖反應

試驗中使用之引子對 CP1up/dw [TGTGA(A/G)GG(A/T/G/C)CC(A/T/G)TGTAA(A/G)GT/GG(A/G)(T/G)T(A/T/G)(C/G)(A/G)(A/G)(T/G)CATG(T/A/C)GTACA(T/G)G] 係以 Wyatt & Brown (1996) 設計之簡併式引子對為模本，參考感染台灣葫蘆科作物之 SLCPHV，加以修飾成而成。另以感染台灣葫蘆科作物之 SLCPHV 與 ToLCNDV 之 V2 基因設計一對專一性引子 SLCVup/dw [GTGGGCCCTC(A/G)ACCA(A/T)TGAAAT/AGGAAC(T/C)AG(A/T)AT(A/G)AGATC(A/G)C(T/G)(A/G)A]，這對引子可以偵測到 SLCPHV 與 ToLCNDV 反應，不會偵測到 begomoviruses 反應。

將供試植株與帶毒粉蝨 DNA 作為板模，利用聚合酶連鎖反應複製植株組織及蟲體內的病毒基因，來判別是否為其他雙生病毒或 SLCPHV。在植株部分，反應體積為 25 µL，包含有 1 µL DNA 模板，2.5 µL 10× PCR buffer，2 mL 2.5 mM dNTP，0.1 µL Ex-Taq polymerase (Takara Chuzo Co., Shiga, Japan)，加入之引子對上下端為 1 µL 20 mM。在粉蝨部分則是加入 DNA 模板增為 3 µL，反應條件為：先預熱至 92℃維持 1 min，接著 92℃反應 30 s，降至 56℃反應 1 min 及 72℃反應 2 min，重複 30 個循環，最終反應在 72℃下持續 6 min，然後保存於 4℃；而 SLCVup/dw 主要用來偵測 SLCPHV，具有較高的專一性，該引子所增幅片段大小約為 250 bp。反應條件則是先預熱至 92℃維持 1 min，接著 92℃反應 30 s，降至 52℃反應 30 s 及 72℃反應 1 min，重複 30 個循環，最終反應在 72℃下持續 6 min，然後保存於 4℃。增幅完成之產物以 1.2% 瓊脂糖凝膠電泳，確認是否出現預期的片段。

田間銀葉粉蝨成蟲帶毒率之檢測

本試驗田位於雲林縣二崙鄉一處隧道式栽培洋香瓜田，第一期作植株自定植後於 2010 年 3 月 26 日設置黏板後開始調查，每週定期調查洋香瓜上銀葉粉蝨密度及 SLCPHV 之罹病率，至 5 月 28 日止。銀葉粉蝨密度監測調查以 10 個黃色黏板 (11 cm × 15 cm) 逢機設置於試驗田中，每週回收後更新黏紙攜回室內，並計算黏紙上銀葉粉蝨成蟲的數量。並在試驗田區內每畦隨機取 5 個調查點，每一調查點觀察 5 株洋香瓜，以目視檢定幼葉是否出現病徵方式調查植株的罹病率。粉蝨是否帶病毒之檢測，則自田間調查帶回的黃色黏板，以蟲針挑取其上的銀葉粉蝨成蟲，樣品數為收回黏板上

粉蝨總蟲數之 10%，若該總數小於 50 隻，則黏板上的粉蝨全數進行 DNA 萃取，若總數的 10% 小於 50 隻，則以 50 隻為最低粉蝨 DNA 萃取數，以上述 PCR 方式檢測粉蝨帶毒率。帶毒粉蝨平均密度之估算則以當週黏板平均誘集成蟲總數及其個別引子對監測黏板上粉蝨帶毒率之乘積。

結果

雙生病毒基因體序列分析與引子設計

以植物 DNA 為模板，經過滾環式擴增法擴增，電泳分析可看到大分子量 DNA 產物 (圖 1A)，利用 begomoviruses 的 DNA-A 在 AV2 基因中共有一 BamHI 的特性，SLCPHV 之 DNA-B 有單一 HindIII 的特性。以 BamHI 或 HindIII 酶切後產生一大小約 2.7 kb DNA (圖 1B，HindIII 酶切圖未出示)，即為全長度 DNA-A 或 DNA-B。經選殖及定序分析，本試驗中採集感染洋香瓜的 SLCPHV 之 DNA-A 有 2,733 個核苷酸，感染番茄的 ToLCTWV 之 DNA-A 共有 2,740 個核苷酸，感染紫花藿香薊的 AYVV 之 DNA-A 共有 2,734 個核苷酸，感染聖誕紅的雙生病毒 DNA-A 有 2,732 個核苷酸，經序列比對與木瓜上的 PaLCGDV 鞘蛋白基因 (Acc. No. AY183472) 有 93.5% 的相同度。SCLPHV 之 DNA-B 有 2,717 個核苷酸。

台灣地區有紀錄感染瓜類的豆類黃金嵌紋病毒屬病毒包含 SLCPHV 與 ToLCNDV 2 種，ToLCNDV 曾發生於宜蘭的東方型甜瓜，因未採到 ToLCNDV 的樣本，因此試驗中僅以 SLCPHV 進行。比較試驗中定序之 SLCPHV 與 GenBank 登錄之 SLCPHV 與 ToLCNDV 各分離株之基因體與各別基因核苷酸之相同度，結果如表 2。雖然 SLCPHV 與 ToLCNDV 各基因間以鞘蛋白基因 (AV1) 的相同度最高，但在各病毒之間亦以鞘蛋白基因相同度最高，來避免專一性引子增幅感染瓜類的豆類黃金嵌紋病毒以外病毒，造成誤判。另選擇 AV2 基因附近差異大的區域設計專一性引子，這對引子只與 SLCPHV 及 ToLCNDV 反應，不與其他 begomoviruses 反應。

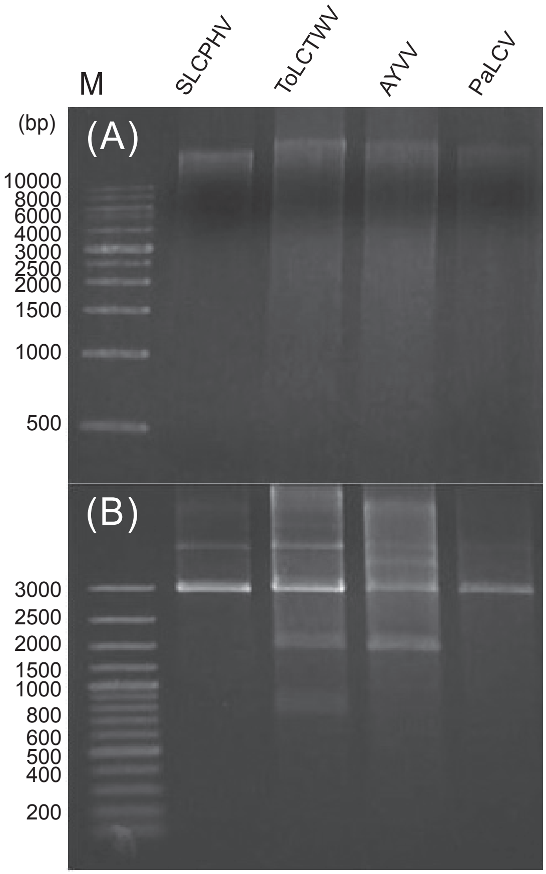

圖 1. 電泳分析已感染雙生病毒之植株 DNA 為模板進行滾環式擴增法之產物 (A) 及產物以 *Bam*HI 酶切之結果 (B)。

Fig. 1. Gel photograph showing (A) high molecular weight DNA fragment obtained by RCA of the infected samples and (B) RCA products digested with *Bam*HI.

CP1up/dw 與 SLCVup/dw 兩引子在不同瓜類作物上的 SLCPHV 偵測之比較

以 CP1up/dw 偵測確認帶有 SLCPHV 之瓜類植株病毒，在聚合酶連鎖反應後，以 1.2% 瓊脂糖凝膠電泳確認結果 (圖 2)，皆可在約 500 bp 左右的位置，有明顯的預期條帶出現 (圖 2A)。在 SLCVup/dw 方面，則可以在 200–300 bp 之間，有明顯的條帶出現 (圖 2B)。結果顯示，以 CP1up/dw 與 SLCVup/dw 兩引子對皆可以在不同瓜類作物上的檢測到 SLCPHV。

表 2. 台灣地區感染瓜類的豆類黃金嵌紋病毒屬病毒基因體與各別基因核苷酸相同度之比較。

Table 2. Comparison of whole genome and similarity of individual genes of cucurbit infected with begomoviruses in Taiwan.

		DNA-A							DNA-B		
Virus	Isolate	WG[z]	AV1	AV2	AC1	AC2	AC3	AC4	WG	BV1	BC1
SLCPHV	TS	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	YL	98.2	98.8	98.6	98.3	98.0	97.8	98.8	97.3	97.6	98.3
	1-1	98.4	99.4	98.3	98.4	94.5	98.5	98.8	97.7	98.4	85.1
	PA1	98.6	99.4	80.8	98.4	98.5	99.0	99.2	-	-	-
	AFPK5slv	98.5	99.2	80.3	98.7	99.3	98.5	98.1	-	-	-
	Wg1	98.1	99.0	98.8	97.9	97.8	97.8	98.4	-	-	-
ToLCNDV	OM	82.8	89.4	71.7	80.1	87.7	86.6	58.1	65.9	69.9	78.7

[z] Sequences of Whole genome. Accession number of *Squash leaf curl Philippines virus* (SLCPHV) isolate YL DNA-A (EU479710), DNA-B (EU479711), isolate 1-1 DNA-A (JF146795), DNA-B (JF746196), isolate PA1 DNA-A (DQ866135), isolate AFPK5slv (EF199774), isolate Wg1 (EU310406), isolate TS (this study), *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) DNA-A (GU180095), DNA-B (GU180096).

CP1up/dw 與 SLCVup/dw 兩引子在罹有雙生病毒的不同植株上之比較

在已感染不同雙生病毒植株及帶病毒粉蝨上，以 CP1up/dw 與 SLCVup/dw 兩引子對偵測結果如圖 3 所示。在植株方面，以 CP1up/dw 偵測結果，在洋香瓜、蕃茄、藿香薊及聖誕紅等皆可以增幅出約 500 的片段，惟聖誕紅部分增幅出的條帶亮度較淡。在 SLCVup/dw 方面，只有洋香瓜可以增幅出 200–300 bp 的預期片段 (圖 3A)。在粉蝨方面，以 CP1up/dw 引子檢測經由 4 種帶毒植株餵食處理的粉蝨，皆可以增幅出約 500 bp 大小的片段；在 SLCVup/dw 方面，只有洋香瓜捲葉病株餵食處理之蟲體可以增幅出 200–300 bp (圖 3B)。除此之外，在植株方面，以 CP1up/dw 增幅結果，聖誕紅帶病植株約在 1 kb 處多產生 1 條亮度較淡的條帶；以 SLCVup/dw 增幅結果，只有帶病毒的聖誕紅植株可增幅出 1 條大小約 1.2 kb 亮度較淺的條帶，這部分推估應來自聖誕紅植株本身 DNA。在粉蝨蟲體部分，SLCVup/dw 在 4 種帶毒植株上，皆可增幅出大小約 300–400 bp 的條帶，推測應來自於粉蝨本身蟲體上的 DNA 所造成的背景值。結果顯示，SLCVup/dw 可以鑑別出同 *Begomovirus* 屬、不同種之病毒，以達到鑑別南瓜捲葉病之高度專一性的需求。

田間粉蝨成蟲帶毒率之檢測

洋香瓜自定植後粉蝨發生密度由平均每 1 黏紙 3 隻逐漸增加，2010 年至 5 月 21 日平均為 1,224 隻 (表 3)。在粉蝨帶毒率檢測部分，本試驗以黏板誘集的粉蝨蟲體萃取 DNA 進行 PCR 檢測是否帶 SLCPHV 或 TYLCNDV，結果顯示 (表 3) 在二崙試驗田所收集黏板上粉蝨成蟲的帶病毒率，以 CP1up/dw 檢測之結果在 (4 月 8–14 日) 粉蝨帶毒率為 32%，之後帶毒率隨天數下降，至 5 月 28 日為 5.4%；以 SLCVup/dw 檢測結果，粉蝨帶毒率自 4 月 8 日開始為 8.0–15.0%，至 5 月 21 日後降為 6.0%，最低為 5.4%。利用所得粉蝨毒毒率分別估算田間帶南瓜捲葉病毒之平均密度，以 CP1up/dw 檢測結果估算以洋香瓜定植後調查至試驗結束為平均每 1 黏板 0–43.3 隻；以 SLCVup/dw 檢測結果估算為平均每 1 黏板 0–73.4 隻，以 5 月 21 日帶毒粉蝨數量最多。

洋香瓜植株罹病率，試驗區自 2010 年第 1 期調查結果顯示 (表 3)，洋香瓜自栽植後 4 wk (4 月 21 日)，約有 22.4% 植株罹病，且隨洋香瓜生長而逐漸增加，至 5 月 21 日時罹病率達 34.4%。

討論

表 1 比較試驗中定序之 SLCPHV TS 分

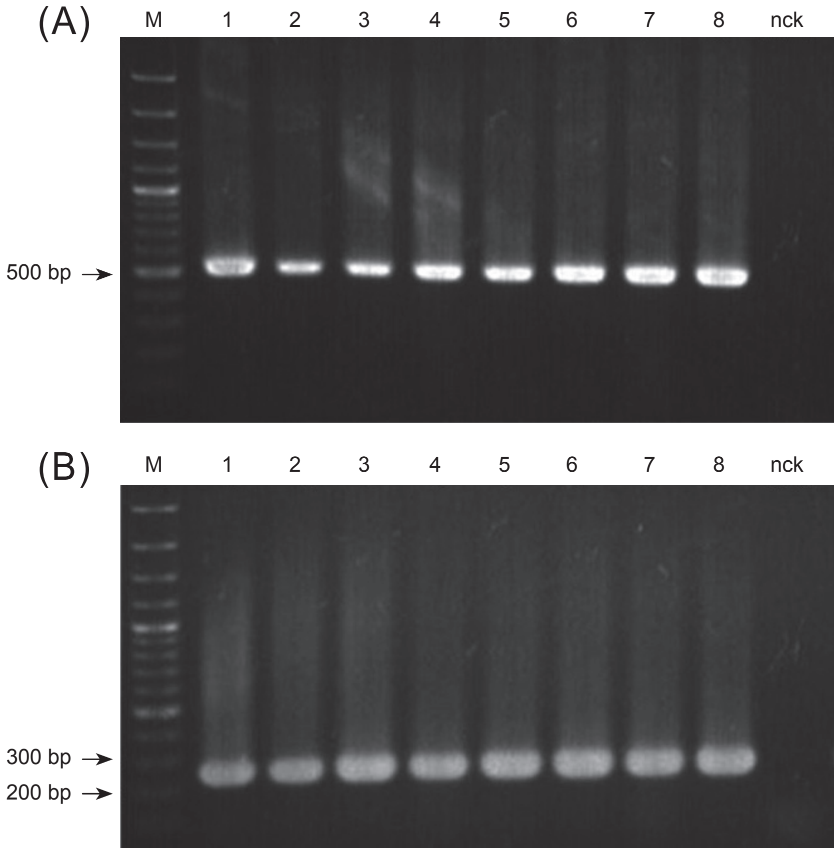

圖 2.　利用 (A) CP1up/dw 與 (B) SLCVup/dw，分別對罹有南瓜捲葉病之瓜類植株 DNA 進行 PCR，其產物經電泳分析結果。(1：洋香瓜；2：西瓜；3：甜瓜；4：哈密瓜；5：扁蒲；6：南瓜；7：胡瓜；8：冬瓜；nck：水；M：marker)。

Fig. 2.　Agarose gel analysis showing the amplification products obtained by PCR with CP1up/CP1dw (A) and SLCVup/dw (B). Detection of SLCV from different SLCV-infected cucumber plants by PCR. Lane 1: *Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Naud.; Lane 2: *Citrullus lanatus*; Lane 3: *Cucumis melo* L. var. *makuwa* Makino; Lane 4: *Cucumis melo* var. *saccharinus*; Lane 5: *Langenaria siceraris* Standl.; Lane 6: *Cucurbitamoschata*; Lane 7: *Cucumis staivus* L.; Lane 8: *Beninecasa hispida*; Lane nck: no DNA control (negative control); and Lane M: 100 bp ladder DNA maker.

離株與 GenBank 登錄之台灣記錄感染瓜類的豆類黃金嵌紋病毒屬病毒 SLCPHV 與 ToLCNDV 各分離株間之基因體與各別基因核苷酸之相同度，SLCPHV 6 分離株的 DNA-A 基因體相同度高於 98.1%，DNA-B 的 3 分離株之基因體相同度高於 97.3%，但個別基因因預測位置不同，使基因大小不同，如分離株 PA1 與 AFPKslv 之 AV2 基因與分離株 1-1 之 BC1 基因，因而降低其相同度之比值。

在台灣有紀錄可藉由銀葉粉蝨傳播的雙生病毒有 6 種，此 6 種病毒之寄主範圍包括茄科作物 (如：番茄、煙草) (Tsai *et al*. 2011)、瓜類作物 (Liao *et al*. 2007; Tsai *et al*. 2007)、豆科作物、木瓜、藿香薊、馬櫻丹、洋桔梗及雜草 (葵錦科藿香薊屬) 等皆是常見於田間或園藝觀賞的植株 (Cheng *et al*. 2007)。調查田區附近若有這些作物，以 CP1up/dw 對田間銀葉粉蝨與洋香瓜植株組織進行病毒偵測，容易會有高估誤判的情形。在試驗結果顯示 (圖 3)，若以原有 CP1up/dw 偵測田間洋香瓜上粉蝨，則無法明確將 SLCPHV 區分出來。以 SLCVup/dw 偵測，則可以明顯將 SLCPHV 與其他雙生病毒區分出來。

此外，在田間粉蝨帶毒率偵測試驗過程

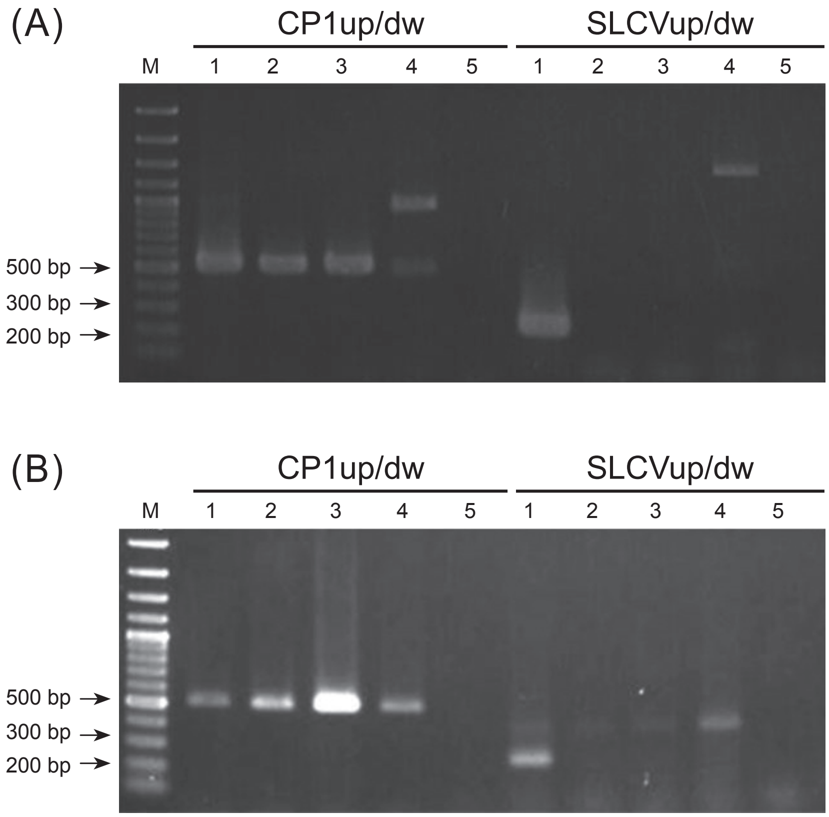

圖 3. 利用 CP1up/dw 與 SLCVup/dw 引子對進行聚合酶連鎖反應，檢測已感染雙生病毒之植株 (A) 與取食過感病植株之粉蝨 (B)，其增幅產物之電泳圖。(bp：marker；1：洋香瓜；2：蕃茄；3：藿香薊；4：聖誕紅；5：水)。

Fig. 3. Agarose gel analysis showing the amplification products obtained by PCR with CP1up/dw and SLCVup/dw. Detection of *begomovirus* from virus-infected plant leaf tissue (A) and whitefly fed on the virus-infected plant (B) by PCR. Lane 1: squash; Lane 2: tomato; Lane 3: ageratum; Lane 4: poinsettia; Lane 5: no DNA control (negative control); and Lane M: 100 bp ladder DNA maker.

中，觀察到 2 對引子皆有檢出的粉蝨 DNA 樣本，CP1up/dw 所增幅出的條帶亮度也普遍比 SLCVup/dw 來的低，推測可能因 CP1up/dw 增幅的產物分子量高於 SLCVup/dw 的產物，也是造成 2010 年 4 月 30 日–5 月 21 日 CP1up/dw 檢出率低於 SLCVup/dw 的原因。在第 1 期 4 月 8–21 日的帶毒率結果 CP1up/dw 檢出率比 SLCVup/dw 來得高，推測可能因田間雜草帶有雙生病毒或者是誘引到田區外帶有雙生病毒的銀葉粉蝨所導致。

以簡併式引子對 (CP1up/dw) 與專一引子對 (SLCVup/dw) 檢測所得估算田間帶毒粉蝨密度，與田間洋香瓜罹病率之趨勢比對，判別兩個引子對監測或預測帶毒粉蝨族群靈敏度及準確度。試驗田區的罹病率自植株定植後呈現逐漸增加的趨勢 (表 3)，至定植後 8 wk (5 月 21 日) 罹病率最高達 34.4%，以 SLCVup/dw 檢測之結果估算田間帶毒粉蝨之密度亦呈現逐漸增高之趨勢，密度最高亦發生在 5 月 21 日；以 CP1up/dw 檢測之結果估算之族群增長之趨勢則與罹病率較不一致，族群密度最高峰較罹病率晚 1 wk (表 3)。故未來以 SLCVup/dw 檢測瓜類雙生病毒檢測及監測帶毒粉蝨之發生，較簡併式的引子對具有更高之靈敏度及準確度。

表 3. 二崙地區洋香瓜田間銀葉粉蝨發生密度及 SLCPHV 罹病率。

Table 3. Incidence rate of whitefly and severity of SLCPHV in cantaloupe field at Erlun, Yunlin County, Taiwan.

Date in 2010	Density of whitefly (Adult/trap)[z]	Rate of viruliferous whitefly (%)		Severity of SLCPHV in field (%)	Number of viruliferous whiteflies (Adults/trap)	
		CP1up/dw	SLCVup/dw		CP1up/dw	SLCVup/dw
Apr. 2	3 ± 0.6	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0
Apr. 8	6 ± 1.6	32.0	8.0	1.1	2.0	0.5
Apr. 14	20 ± 0.8	32.0	8.0	1.0	6.3	1.6
Apr. 21	44 ± 4.7	18.0	14.0	22.4	8.0	6.2
Apr. 30	102 ± 15.8	5.0	15.0	28.2	5.1	15.4
May 21	1224 ± 143.3	2.0	6.0	34.4	24.5	73.4
May 28	809 ± 179.7	5.4	5.4	22.6	43.3	43.3

[z] Mean ± SEM.

然而愈接近生長後期，其他瓜類病害愈易發生交互感染，如白粉病、萎凋病、西瓜銀斑病、甜瓜黃斑病、缺綠黃化病、果斑病、洋香瓜黑點根腐病等等病害陸續發生，造成部分洋香瓜植株死亡，影響罹病率計算，為導致 5 月 28 日罹病率的下降的因素之一 (表 3)。除此之外，在罹病率觀察中，影響南瓜捲葉病病害病徵的判斷除了個人主觀判斷的人為因素外，田間的其他病害發生，造成植株受到多種病害感染。若其他病害病徵表現在瓜葉上，將影響南瓜捲葉病的病徵表現，如瓜類萎凋病或者多種病毒複合感染，則會影響洋香瓜南瓜捲葉病病徵的辨別，故利用分子生物鑑定法來檢測感病率即可克服此等問題。

引用文獻

Chang, H. H., H. M. Ku, W. S. Tsai, R. C. Chien, and F. J. Jan. 2010. Identification and characterization of a mechanical transmissible *begomovirus* causing leaf curl on oriental melon. Eur. J. Plant Pathol. 127:219–228.

Chang, L. S., Y. S. Lee, H. J. Su, and T. H. Hung. 2003. First report of *Papaya leaf curl virus* infecting papaya plants in Taiwan. Plant Dis. 87:204.

Cheng, Y. H., C. C. Chen, Z. Y. Wang, and C. A. Chang. 2007. Whitefly-transmitted geminiviruses in ornamental plants in Taiwan. p.269–278. *in*: Proceeding of 2007 Symposium on Plant Vector-Borne Disease and Control Strategies. October 26, 2007. Taichung, Taiwan. National Chung Hsing University. Taichung. (in Chinese with English abstract)

Chung, M. L., C. H. Liao, M. J. Chen, and R. J. Chiu. 1985. The isolation, transmission and host range of sweet potato leaf curl agent in Taiwan. Plant Prot. Bull. 27:333–341. (in Chinese with English abstract)

Deng, T. C. 2011. Evolutionary change of trends in prevalence of cucurbits-infecting viruses in Taiwan, 1981–2011. p.147–163. *in*: Proceedings of the Symposium on Integrated Management Technology of Insect Vectors and Insect-Borne Diseases. July 15, 2011. Taichung, Taiwan. Special Publication of Taiwan Agric. Res. Inst. Taichung. (in Chinese with English abstract)

Fauquet, C. M., R. W. Briddon, J. K. Brown, E. Moriones, J. Stanley, M. Zerbini, and X. Zhou. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. Arch. Virol. 153:783–821.

Inoue-Nagata, A. K., L. C. Albuquerque, W. B. Rocha, and T. Nagata. 2004. A simple method for cloning the complete *begomovirus* genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. J. Virol. Methods 116:209–211.

Jan, F. J., S. K. Green, S. L. Shih, L. M. Lee, H. Ito, J. Kimbara, K. Hosoi, and W. S. Tsai. 2007. First report of *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* in Taiwan. Plant Dis. 91:1363.

Jones, D. R. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. Eur. J. Plant Pathol. 109:195–219.

Liao, J. Y., C. C. Hu, T. K. Lin, C. A. Chang, and T. C. Deng. 2007. Identification of Squash leaf curl Philippines virus on *Benincasa hispida* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 16:11–18. (in Chinese with English abstract)

Lin, F. C., S. C. Chang, Y. H. Cheng, C. L. Wang, and C. C. Hu. 2011. Silverleaf whitefly vector for geminiviruses on vegetables and their control. p.193–203.

in: Proceedings of the Symposium on Integrated Management Technology of Insect Vectors and Insect-Borne Diseases. July 15, 2011. Taichung, Taiwan. Special Publication of Taiwan Agric. Res. Inst. Taichung. (in Chinese with English abstract)

Lin, F. C., T. H. Su, and C. L. Wang. 1997. Effect of temperature on development and reproduction of silverleaf whitefly (*Bemisia argentifolii*) an its population fluctuation on poinsettia. Chinese J. Entomol. 17:66–79. (in Chinese)

Tsai, M. C., C. S. Liu, and H. J. Su. 1997. Poinsettia leaf curl, a new disease caused by a geminivirus. J. Phytopathol. 145:347–350.

Tsai, W. S., S. L. Shih, S. K. Green, and F. J. Jan. 2007. Occurrence and molecular characterization of *Squash leaf curl Phillipines virus* in Taiwan. Plant Dis. 91:907.

Tsai, W. S., S. L. Shih, L. Kenyon, S. K. Green, and F. J. Jan. 2011. Temporal distribution and pathogenicity of the predominant tomato-infecting begomoviruses in Taiwan. Plant Pathol. 60:787–799.

Wu, C. Y., Y. C. Lai, N. S. Lin, Y. H. Hsu, H. T. Tsai, J. Y. Liao, and C. C. Hu. 2008. A simplified method of constructing infectious clones of *begomovirus* employing limited restriction enzyme digestion of products of rolling circle amplification. J. Virol. Methods 147:355–359.

Wyatt, S. D. and J. K. Brown. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. Phytopathology 86:1288–1293.

Development of Primers for Detection of Whiteflies Carrying Leaf Curl Disease: Causing Agents

Ying-Huey Cheng[1], Han-Chao Lin[2], and Feng-Chyi Lin[3,*]

Abstract

Cheng, Y. H., H. C. Lin, and F. C. Lin. 2015. Development of primers for detection of whiteflies carrying leaf curl disease: Causing agents. J. Taiwan Agric. Res. 64(2):135–144.

A viral disease caused by *Squash leaf curl Philippines virus* (SLCPHV), a begomoviurs transmitted by *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring, is one of the most popular and serious diseases in muskmelon cultivation during the last decade in the central and southern Taiwan. In addition to SLCPHV, there are many begomoviruses transmitted by whitefly in Taiwan. Polymerrase chain reaction (PCR) assay with degenerated primers has been widely used for general detection of begomoviruses. The degenerated primer pairs CP1up/dw were designed based on the capsid protein gene of recorded begomoviruses in Taiwan and could amplify the viral DNA fragment of ca. 500 bp. The other degenerated primer pairs SLCVup/dw were designed to specifically target capsid protein gene of SLCPHV and *Tomato leaf curl New Dali virus*, i.e., two causing agents of squash leaf curl disease in Taiwan, and could amplify the viral DNA fragment of ca. 250 bp. In field survey of whitefly infection rate, results indicated that detection with CP1up/dw resulted in higher positive ratio than SLCVup/dw. Viruliferous whieflies could be detected with primer pairs CP1up/dw rather than with SLCVup/dw. Results showed that whitefly carried other *begomovirus* instead of SLCPHV. Comparison with CP1up/dw, the primer pairs SLCVup/dw possessed higher sensitivity and accuracy and therefore, they were more suitable for inspection of squash leaf curl disease and infection rate of *B. argentifolii*.

Key words: *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring, *Squash leaf curl Phillipines virus* (SLCPHV), *Cucurbits*, Primer.

Received: August 7, 2014; Accepted: December 29, 2014.
[*] Corresponding author, e-mail: fclin@tari.gov.tw
[1] Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Research Assistant, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Associate Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(2):145–158 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06402.07 研究報告

水稻白葉枯病抗性突變體接種白葉枯病菌之轉錄體學研究

黃巧宜 [1] 周思儀 [2] 李雅琳 [3] 曾文彬 [1] 陳純葳 [4] 王強生 [5,*] 林大鈞 [6,*]

摘要

黃巧宜、周思儀、李雅琳、曾文彬、陳純葳、王強生、林大鈞。2015。水稻白葉枯病抗性突變體接種白葉枯病菌之轉錄體學研究。台灣農業研究 64(2):145–158。

白葉枯病是由 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 所引起的水稻嚴重病害。本研究為了開發新的抗性基因，利用「台農 67 號」(‘TNG67’) 及具持久抗性之 SA0423 突變體為材料，接種台灣水稻白葉枯病抗性檢定圃專用菌株 XF89b，並利用微陣列晶片分析接種後之轉錄體變化。所得結果經由 One-way ANOVA 及 Student-Newman-Keuls (SNK) 分析，發現在 SA0423 專一表現的轉錄子有 2,727 個，‘TNG67’ 則有 3,585 個，而兩者皆有表現之轉錄子則高達 18,432 個。利用「代謝路徑的註解」、「比對已發表的抗性基因座」、「比對植物-病原菌交互作用代謝路徑」及「BioLayout Express 3D 表現分群」等方法，進一步篩選出 59 個抗性相關基因，再經由 real-time RT-PCR 分析確認，結果發現 17 個基因的表現符合微晶片分析結果。最後利用文獻檢索，分析這 17 個基因與抗性的關聯性，結果發現它們可能參與「植物-病原菌交互作用」、「植物荷爾蒙生合成」、 細胞自噬作用」及「免疫機制啟動的訊息傳遞」等與抗性相關的代謝路徑。這些結果除可作為探討 SA0423 的抗性機制外，亦可進一步選殖表現數量基因座 (expression quantitative trait loci; eQTL) 與分子標誌，應用於未來水稻白葉枯病抗性之分子育種。

關鍵詞：水稻、白葉枯病、抗性、突變體、轉錄體。

前言

水稻白葉枯病 (rice bacterial blight disease) 主要由 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 引起，係水稻栽培的嚴重病害之一，可造成水稻減產達 50% (Gnanamanickam *et al*. 1999)。在台灣地區，白葉枯病經常發生於第 2 期稻作，尤其是颱風過後，經常造成產量的嚴重減損，乃目前國內主要的水稻病害 (Hsieh 2003)。

慣行農法常利用藥劑、栽培管理與栽培抗性品種等方法，防治白葉枯病。其中，抗性品種的種植，可減少農藥的使用，避免環境汙染及節省成本，是公認為最有效且經濟的防治手段 (Yang *et al*. 2003)。因此，抗性品種的選育，在白葉枯病猖獗的今日，越顯重要。迄今已在水稻發現有 35 個以上的抗性基因座，分別命名為 *Xa1* 至 *Xa36* (Lin *et al*. 1996; Nino-Liu *et al*. 2006; Zhang 2007; Shanti *et al*. 2010)。其中，*Xa1*、*xa5*、*xa13*、*Xa21*、*Xa3*/*Xa26* 及 *Xa27* 等基因已被選殖 (Song *et al*. 1995; Yoshimura *et al*. 1998; Iyer & McCouch 2004; Sun *et al*. 2004; Gu *et al*. 2005; Chu *et al*. 2006; Jiang *et al*. 2006; Xiang *et al*. 2006)。國際稻米研究所 (International Rice

投稿日期：2014 年 8 月 6 日；接受日期：2015 年 1 月 17 日。
[*] 通訊作者：wangchansen@nchu.edu.tw 及 dagin@tari.gov.tw
[1] 國立中興大學農藝學系研究助理。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系助理研究員。台灣 嘉義市。
[3] 農委會農業試驗所生物技術組副研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所植物病理組聘用助理研究員。台灣 台中市。
[5] 國立中興大學農藝學系教授。台灣 台中市。
[6] 農委會農業試驗所生物技術組聘用副研究員。台灣 台中市。

Research Institute; IRRI) 利用極感病的 'IR24' 品系作為輪迴親，建立帶有不同 *Xa* 基因的 IRBB 系列近同源系 (near isogenic lines)，目前已被進一步發展為良好的 *Xa* 基因提供親，應用於抗性育種 (Huang *et al*. 1997)。亦有學者利用比較遺傳圖譜 (comparative genetic map) 方法，根據 IRRI 的研究結果，開發出許多可應用的分子標誌，進行優良品種的抗性改良 (Kottapalli *et al*. 2006; Sama *et al*. 2014)。

Xa21 抗病基因產物，可啟動 *Xa21* 媒介的免疫作用 (Xa21-mediated immunity)，而帶有 *Xa21* 的水稻植株，通常對許多白葉枯病菌生理小種具有廣幅抗性 (Bai *et al*. 2006; Lee *et al*. 2009; Lee *et al*. 2011)。然而，IRBB21 (*Xa21*) 卻對台灣本土 XF89b、XM1 及 XM42 等分離菌株，不具明顯的抗性 (Wang *et al*. 2013)，其可能是台灣本土菌株的致病機制與國外流行菌株不同所致，導致這些品系的抗性不佳。此外，由於長期栽培單一抗性水稻品種，可能會改變栽種區域的病原菌的生理小種或菌相改變，而導致抗性崩解，如帶有 *Xa4* 的改良品種在釋出後，很快就發生「抗性崩解」(Khush *et al*. 1989; Mew *et al*. 1992)。因此，育種家認為堆疊多個不同抗性基因，可以減緩抗性的崩解，為重要的育種策略。所以，進行抗病種原與新型抗性基因的開發，以因應菌相的演化，是抗病育種之首要工作 (Wang *et al*. 2013)。

行政院農委會農業試驗所已累積多年白葉枯病的研究經驗，早於 1996 年的年報即指出，在水稻供試品種 (系) 接種 151 株的本土菌株上，發現 XF89b 可使 26 個具有 *Xa* 抗性基因的水稻品系 (IRBB 近同源系) 感病。至今的接種試驗顯示，XF89b 仍是一極強的致病菌株。另一方面，本所利用疊氮化鈉 (sodium azide) 誘變，建立一套 'TNG67' 誘變庫，現存約有 3,000 個突變體純系，分別帶有分蘗數、株高、香氣、澱粉生合成、抗病蟲害及早熟等不同性狀 (Wang *et al*. 2002)。經過多年多期作之台灣本土菌株 (XF89b、XM1 及 XM42) 的抗性檢定，目前已篩選出 7 個抗病突變體 (SA0405、SA0408、SA0421、SA0423、SA0424、SA0912、SA1613.1)，以及另一較 'TNG67' 更感病的 SA0422 突變體。其中，SA0423 突變體的株型與 'TNG67' 較類似，且多年抗性檢定表現穩定。因此，本研究以 SA0423 突變體 (R) 與感病的 'TNG67' (S) 為材料，接種台灣水稻白葉枯病抗性檢定圃專用菌株 (XF89b) 後，利用微陣列晶片分析其轉錄體的表現，探討可能參與 SA0423 抗病機制的基因。所得結果將可做為日後開發表現數量基因座 (expression quantitative trait loci; eQTL) 的分子標誌，應用於未來抗性之分子育種。

材料與方法

試驗材料

本研究選用對白葉枯病菌極為敏感的「台中在來一號」('TN1'，highly susceptible，HS；感性對照品系)、感性的 'TNG67' (susceptible, S) 及具廣幅抗性的 SA0423 突變體 (resistant, R)，分別依慣行農法種植於溫室，作為轉錄體分析材料。白葉枯病菌則以農試所植病組稻作病害實驗室所保存的白葉枯病 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XF89b (採集地：台中) 作為供試菌株。

白葉枯病菌之接種源製備、接種與病勢調查

在接種源製備方面，將 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b 於室溫下，畫線培養於 523 固態培養基 (1% sucrose、0.8% casein hydrolysate、0.4% yeast extract、0.2% K_2HPO_4、0.03% $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 及 1.5% agar)，進行活化 72 h 後，再挑選單一菌落接種於新鮮培養基，並於室溫下進行馴化培養 72 h 後，轉移至 523 液態培養基 (1% sucrose、0.8% casein hydrolysate、0.4% yeast extract、0.2% K_2HPO_4 及 0.03% $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$)。於室溫下、150 rpm 震盪培養 72 h。接著，調整菌液濃度為 10^9 CFU mL^{-1}，作為白葉枯病菌之接種源。

供試水稻植株於溫室種植至最高分蘗期 (maximum tillering stage，約 60−80 d)，依據剪葉接種法 (Kauffman *et al*. 1973)，進行病原

菌的接種。接種前，先將消毒的剪刀刀刃處完全沾滿菌液，接著於每個分櫱的最上位完全展開葉，距葉尖 1−2 cm 之處，進行剪葉接種。所有接種均在 1 h 內完成。接種後，於 0、0.5、1、2 及 6 h 等時間點，採取自接菌切口以下 2 cm 葉片，作為 RNA 樣品製備的材料，並在感性對照品系 'TN1' 病斑長度達全葉 3/4 時，記錄病斑。

總量 RNA 之萃取

依據 Chirgwin *et al*. (1979) 的方法，進行水稻總體 RNA 的萃取。取 0.3−0.5 g 新鮮水稻葉片，經液態氮急凍後，以研缽及杵磨成細粉，並逐次加入 10 mL 萃取緩衝液 (100 mM Tris-base、20 mM EDTA-Na_2、200 mM NaCl、4% SDS、16 mM DTT、1 μg mL^{-1} 2-mercaptobenzothiazole) 及等體積 phenol，以 12,000× *g* 離心 10 min。接著，取上清液加入等體積的氯仿混合均勻後，以 12,000× *g* 離心 10 min。之後，取上清液加入 1/3 倍體積的 8 M 氯化鋰，混合均勻後，置於 4℃進行過夜沉澱。然後，於 4℃下 12,000× *g* 離心 30 min，取得沉澱物，並回溶於 2 mL 無菌去離子水，再加入 0.1 倍體積 3 M 醋酸鈉緩衝液 (pH 5.2) 及 2.5 倍體積絕對酒精，再次沉澱 RNA。最後，RNA 回溶於含 RNAsecure (Ambion) 之無菌去離子水。取適量樣品，以 320−220 nm 吸光值測定其濃度及品質，並進行 RNA 甲醛瓊脂膠體電泳分析，以確定 RNA 的完整性，隨後即分裝保存於 -70℃備用。

水稻 cDNA 微晶片 (microarray) 之設計

水稻基因轉錄體序列由 MSU Rice Genome Annotation Project (Version 6.1) 下載，共有 56,797 個基因座 (loci)，去除同一基因上替代剪切 (alternative splicing sequences) 的轉錄子，其獨特基因 (unique gene) 數為 47,154。使用 Agilent Oligo Microarray (60K, custom-made, Agilent Technologies) 晶片，其上分布 8 個雜合區 (8 sub-arrays)。探針序列的設計是使用 Agilent eArray system 軟體，針對 56,797 個基因座轉錄體之 3' 端 1 kb 長度範圍內，設計約 60 mers 的序列作為探針，故每個 sub-array 均含完整且完全一致的水稻轉錄子探針。

cDNA 微陣列雜合反應 (hybridization) 及轉錄體分析

取兩品種 (系) 接種後 0、0.5、1、2 及 6 h 的 RNA 樣品進行雜合反應。RNA 的需求濃度為 2−3 μg $μL^{-1}$，總量為 25 μg。於中央研究院微矩陣核心實驗室進行晶片雜合反應。送件 RNA 樣品通過 Bioanalyzer RNA QC 檢驗達微晶片分析標準後 [品質必須符合 (OD260−OD320)/(OD280−OD320) ≥ 1.9、(OD260−OD320)/(OD230−OD320) ≥ 1.8]，取 1 μg RNA 使用 Amino Allyl MessageAmp aRNA Kit (Ambion Cat. Am1753) 複製 RNA，並以 Alexa Flour 555 Reactive Dyes (Invitrogen) 進行 RNA 樣品的標誌，再將 RNA 碎片化 (fragmentation) 後，進行 cDNA 微晶片的雜合反應。於 65℃雜合反應 17 h 後，使用 Agilent DNA microarray scanner (G2565CA, Agilent Technologies) 掃描 cDNA 微晶片，再利用 Feature Extraction software (version 10.7.1.1) 分析掃描之影像。最後，產生的轉錄體數據，利用 GeneSpring 11.5 軟體 (Agilent Technologies)，進行 One-way ANOVA 及 SNK 檢定 (Student-Newman-Keuls test) 分析。

轉錄子功能分析首先利用 g:Profiler (http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gconvert.cgi) 網站，將轉錄子序號 (MSU accession number) 轉換 UNIPRO TSPTREMBL_ACC 的序號，再以 DAVID (The Databasefor Annotation, Visualization and Integrated Discover) 網站 (http://david.abcc.ncifcrf.gov/)，分析每個轉錄子可能參與的代謝路徑。

抗性基因座及水稻抗病生理代謝途徑資料庫之檢索與比對

檢索中國水稻數據中心 (http://www.ricedata.cn)、Oryzabase (http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabaseV4) 及 Gramene (http://www.gramene.org) 網站所發表的白葉枯病抗性基因座，並整合以上資料與相關文獻，檢索鄰近基因座的 SSR 分子標誌，再利用 Gramene 網站

的「Comparative map」工具，將基因座定位在水稻基因體的物理圖譜。接著，利用 OryGenesDB 網站 (http://orygenesdb.cirad.fr/) 檢索差異表現轉錄子在物理圖譜的位置，並與上述基因座位置進行比對，檢索座落此區間的差異表現轉錄子的物理圖譜位置。另一方面，自 KEGG 網站 (http://www.genome.jp/kegg)，檢索水稻細胞中參與抗病生理代謝 (plant-pathogen interaction-*Oryza sativa* japonica) 之基因，並檢視其是否為本次分析所得的差異表現轉錄子。

轉錄子表現分群

由統計分析後得到之差異轉錄子，經 BioLayout Express3D (Version 2.2) 進行表現分群 (clustering) (Theocharidis *et al*. 2009)。生物資訊分析條件：相關係數設定為 0.95，minimum component size 設定 5，inflation 設定 2.2，smallest cluster allowed 設定 4。

即時逆轉錄聚合酶連鎖反應 (real-time RT-PCR)

使用 SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) 將總量 RNA 反轉錄成 cDNA：加 1 μL 10 mM oligo d(T)18 引子 (表 1) 於 2 μg 總量 RNA 樣品，經 80℃、10 min 變性後，隨即置於 4℃下，再逐一加入 1 μL 0.1 M DTT、4 μL 2.5 mM dNTP (TaKaRa)、4 μL 5× first-strand buffer、1 μL RNaseOUT、1 μL SuperScript IIReverse Transcriptase (200 U μL^{-1})，並調整總體積為 20 μL。於 25℃、10 min 及 42℃、90 min 作用後，再以 95℃、5 min 終止反應，所得即為 cDNA。接著再以 KAPA™ SYBR® FAST qPCR 試劑組進行 PCR，取 4 μL 稀釋 20 倍的 cDNA，加入 10 μL 2× master mix、0.4 μL 10 μM 引子 (表 1)、0.4 μL 50× ROX Low 及 4.8 μL 去離子水，置於多重螢光基因定量光譜分析儀 (ABI 7500, Life Technologies Co., Ltd.)，進行即時定量 PCR 反應。PCR 條件設定如下：95℃、2 min 30 s，將模版變性；接著，進行增幅階段，95℃變性 30 s，黏合反應於 60℃下進行 30 s，72℃聚合反應 32 s，此反應進行 40 次循環。解離反應 (dissociation) 在 95℃進行 15 s，60℃進行 1 min，95℃進行 15 s，60℃進行 15 s。

表 1. 即時定量 RT-PCR 引子之序列。

Table 1. Sequences of primer for real-time RT-PCR analysis.

Primer	Sequence (5’ → 3’)
Ankyrin F	TACGCATTCTTCCATCATCA
Ankyrin R	TTTCTCCACCCACATTCC
ATG1_F	GAGGCACAGATAGATTTG
ATG1_R	GTCACTCAGTCGTTATTC
CaM_chr1-1_F	GGTCAGATCAATTACGAAGA
CaM_chr1-1_R	TTACTACCACCAGGAGAG
CaM_chr1-2_F	TTCAGAGACATCCTATGCT
CaM_chr1-2_R	ACAACAGAATGGCTACAC
CaM_chr2_F	ATCCGCTTGTGTCAGAAG
CaM_chr2_R	CGAATGAATCAACCAATGTCTC
CaM_chr5_F	GGAGTTCGTTAAGGTCAT
CaM_chr5_R	TACCACCAGCAAAGATAG
CMPG1_F	GCTAGGTCAAGAACACAATCAA
CMPG1_R	ACTGCCAAATACGGTCTGT
DUF1c_F	TTACTTCTATGTCCGATCCA
DUF1c_R	TGATTACTGTCCACTGTCT
FMO_2F	GAGCATTCATTCGTTCGT
FMO_2R	ATCATCTCGAAGGTGTAG
JOM_F	ATCTATCGACGTGTTCAC
JOM_R	CACCTTCTCCTTGTTGTA
Oligo g (T)18	GTTTTTTTTTTTTTTTTTT
PxMP_F	CCACGAGTTCATAATCAGA
PxMP _R	CGCATCATAGTCCAGTTA
SAM_F	GGAAGGATGAGGATGTAT
SAM_R	ATAGGTAGGTAGGTTGAAG
SNARE_F	GGCTGTTCAATCTGTATCA
SNARE_R	TGGACTCGTGGATGTTAT
Ubi-F1	ACACTTGTGATTCAGTTCCA
Ubi-R1	TGCAGTGTCGATGAAACC
Xa2_F	TGGTGGTCTGAATCTGAT
Xa2_R	GCCTCCTCATCAAGAAAG
xa5-2F’	CATGTGCCTCACTGAGAC
xa5-2R	ATAGACTTATCAAACTGGACAAGA
Xa25_F	TTTGGGATGGTGATGGTA
Xa25_R	TACAACAGAAGCGGAAAC

結果與討論

SA0423 與 'TNG67' 接種 XF89b 之 cDNA 微晶片分析

最高分蘗期時將抗病之 SA0423 突變體與感病之 'TNG67'，接種本土高致病性的分離株 XF89b，並於接種後第 7、14、21 及 28 d，觀察接種葉片的病斑形成 (圖 1)，結果發現 'TNG67' 及感性對照品系 'TN1' 的病斑隨著接種時間而增長，但 SA0423 突變體的病斑幾乎維持在一定長度，顯示 SA0423 確實對 XF89b 分離株有明顯的抗性。接著，進行 'TNG67' 及 SA0423 接種後不同時間之轉錄體分析 (表 2)，結果發現接種後的 SA0423 細胞內具有 21,159 個差異表現轉錄子，'TNG67' 則有 22,017 個，進一步排除非品系專一性之差異表現的 18,432 個轉錄子，得知於 SA0423 專一差異表現轉錄子有 2,727 個，而在 'TNG67' 專一差異表現轉錄子則有 3,585 個。

將上述所發現的差異表現轉錄子，依品種 (系) 分別利用 DAVID Web site 進行 GO (gene ontology) 的註解，並建構水稻細胞接種後所誘導的代謝路徑 (圖 2)。目前本研究已完成所有發現的差異表現轉錄子之 GO 註解，可作為重建「水稻宿主受病原菌入侵後的生理代謝」的基礎資料。同時，亦可利用參與代謝路徑的註解，進一步探討與植物與病原菌反應有關的代謝，進而篩選抗性相關基因。

接種後在兩品種 (系) 間均有差異表現轉錄子的 GO 註解結果部分，發現轉錄子可能參與在澱粉、蔗糖、含硫胺基酸 (cysteine、methionine) 及含醇基的胺基酸 (serine、threonine) 等代謝。目前，這些代謝路徑與病原菌入侵植物細胞間的關聯性，仍不清楚。而 SA0423 突變體於接種後之專一差異表現轉錄子，則可能參與胺醣 (amino sugar)、核苷酸醣 (nucleotide sugar)、乙醛酸鹽 (glyoxylate)、二羧酸鹽 (dicarboxylate) 及胺基酸 (alanine、aspartate、glutamate、arginine 及 proline) 等代謝路徑。同時，亦有部分轉錄子參與甘油磷脂 (glycerophospholipid) 及維生素 B1 (thiamine) 的代謝。其中，甘油磷脂為細胞膜的主要組成分；而維生素 B1 可能在植物抗病機制中，扮演活化因子的角色，可誘導植物的免

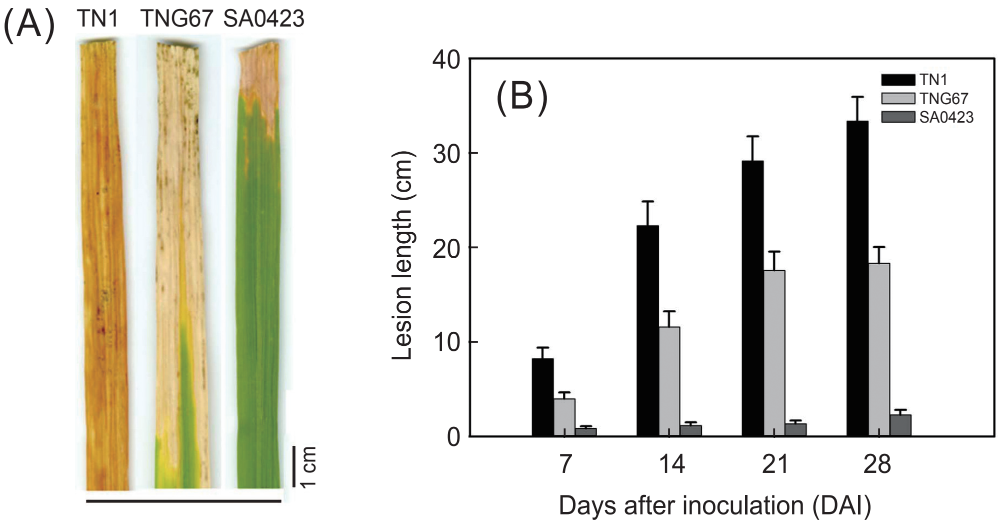

圖 1. 'TN1'、'TNG67' 及 SA0423 接種白葉枯病菌 XF89b 之抗性調查。(A) 接種 28 d 的病斑外觀；(B) 接種後之病斑長度調查 (bar = Standard deviation)。

Fig. 1. The disease response by leaf lesion (cm) in'TN1', 'TNG67' and SA0423 after inoculation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XF89b. (A) Morphology of leaf lesion at 28 days after inoculation (DAI); (B) Leaf lesion investigated at various DAI. (bar = standard deviation).

表 2. 微陣列晶片分析：轉錄子之篩選步驟、條件及數量。
Table 2. Microarray analysis: steps, conditions and number of transcripts screening.

Step	Condition	Time after infection (h)	Transcripts SA0423	Transcripts TNG67
Preliminary screening	Total transcript		61,713	61,713
	Deduct the controls		61,657	61,657
One-way ANOVA	Deduct expression < 50		26,900	26,900
	Compare each transcriptome of TNG67 and SA0423		22,506	23,260
Post-hoc test (SNK)	Compare the transcriptomes after inoculation with the transcriptomes at 0 h in each line	0.5	9,592	10,901
		1	12,893	11,775
		2	14,964	14,825
		6	15,466	15,102
Comparative analysis(Union)	Contain the non-line specific transcripts and line specific transcripts		21,159	22,017
Comparative analysis(Intersection)	Deduct the non-line specific transcripts (18,432 transcripts)		2,727	3,585

疫系統，使植物獲得抗性 (systemic acquired resistance, SAR) (Ahn *et al*. 2005)。另一方面，‘TNG67’ 於接種後之專一差異表現轉錄子，則主要參與多醣 (N-glycan) 的合成及遺傳訊息處理 (genetic information processing)，如鹼基的切除修復 (base excision repair)、DNA 複製、核苷酸的切除修復 (nucleotide excision repair) 及同源重組 (homologous recombination) 等。此結果顯示，接種後的 ‘TNG67’ 細胞可能受到 XF89b 病菌的入侵與破壞，因而啟動核酸的修復及複製機制。但這些結果仍需進一步試驗方能證實。

抗性候選基因的篩選

篩選步驟首先自中國水稻數據中心、Oryzabase 及 Gramene 等網站，檢索目前已發表的白葉枯病抗性基因座。結果發現，水稻基因體中含有 42 個可能的白葉枯病抗性基因座。其中，*Xa1*、*xa5*、*xa13*、*Xa21*、*Xa3*/*Xa26* 和 *Xa27* 等基因已被選殖及定序 (Song *et al*. 1995; Yoshimura *et al*. 1998; Iyer & McCouch 2004; Sun *et al*. 2004; Gu *et al*. 2005; Chu *et al*. 2006; Jiang *et al*. 2006; Xiang *et al*. 2006)。利用「Comparative map」(Gramene Web site) 檢索這些基因座在物理圖譜的位置，利用 OryGenesDB 網站，分析位在這些區間的差異表現轉錄子。結果發現接種後有 1,141 個為 SA0423 突變體專一表現轉錄子。進一步比對被註解的生化功能，發現有 32 個轉錄子可能與抗性有關，其中包含 *xa5* 與 *Xa25* 兩個已被選殖的抗性基因。*xa5* 編碼 RNA 聚合酶的 γ 次元 (subunit)，因發生兩個鹼基的突變，而導致胺基酸的置換，失去功能 (Iyer & McCouch 2004)。學者推論，白葉枯病菌利用第 III 型分泌系統，運送 transcription activator like effectors (TALEs) 至宿主細胞時，因 *xa5* 導致相對應的RNA聚合酶失活，無法與TALEs結合，進而無法啟動下游感性基因的表現，造成水稻的抗性表現 (Bogdanove *et al*. 2010)。然而，*Xa25* 的抗性機制，目前仍不清楚。

利用 KEGG Web site 檢索水稻中植物 - 病原菌交互作用路徑 (Plant-pathogen interaction-*Oryza sativa japonica*, osa04626)，發現其中 69 個基因參與此代謝路徑 (圖 3)。進一步與 SA0423 突變體專一表現轉錄子比對，結果發現 14 個轉錄子 (來自 6 個基因) 可能參與此代謝路徑 (圖 3)。其中，包含離子調控有關的基因，如 calcium-dependent protein kinase (*CDPK*) 與 calmodulin/calcium-binding protein (*CaM/CML*)；與過敏反應有關的基

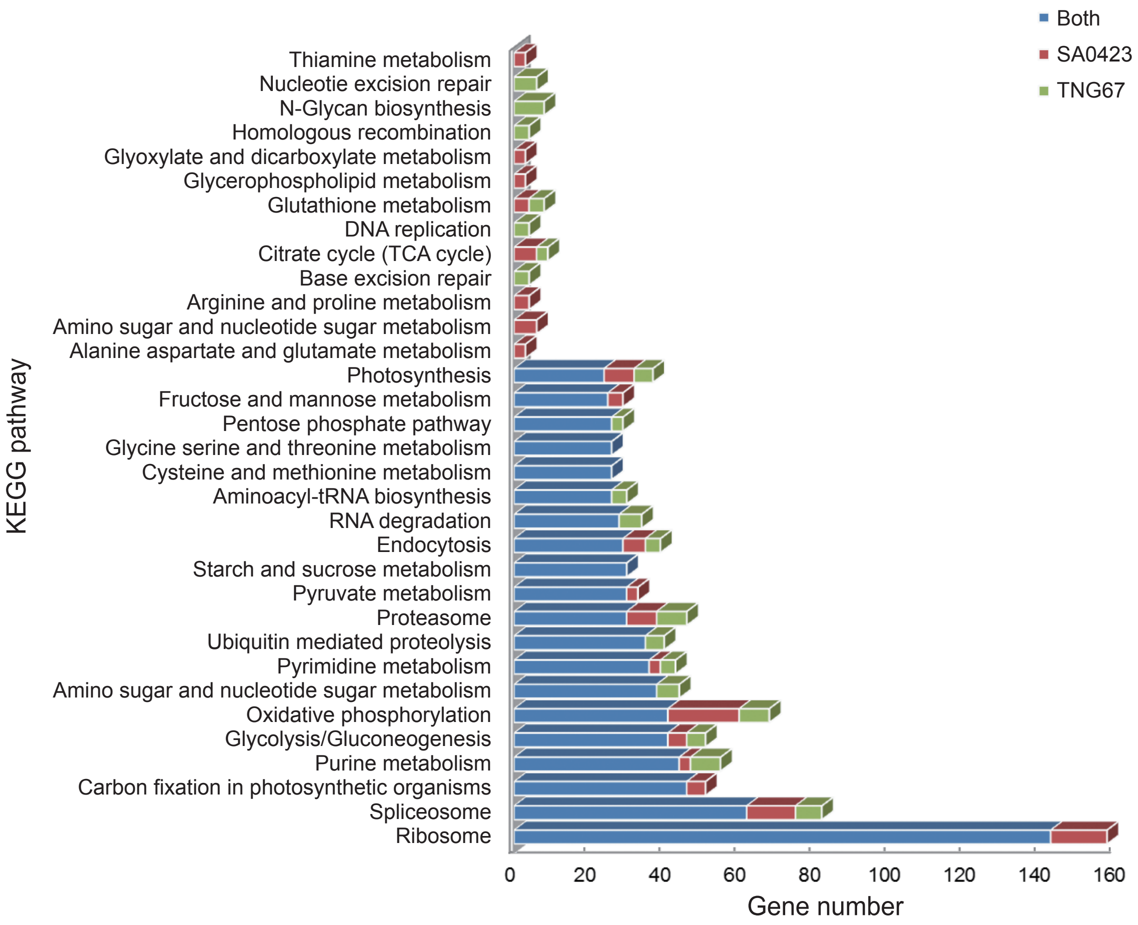

圖 2. 接種病原菌 XF89b 後，SA0423、‘TNG67’ 及同時存在兩品系之差異轉錄子所參與的代謝路徑。
Fig. 2. The metabolic pathways of differentially displayed transcripts present in SA0423, ‘TNG67’ and both lines in response to pathogen (XF89b) inoculation.

因，如 heat shock protein (*HSP*) 與 respiratory burst oxidase (*Rboh*)；與茉莉酸代謝途徑相關之 coronatine-insensitive protein 1 (*COI1*)；及訊息傳遞相關之 mitogen-activated protein kinase kinase (*MKK*)。由轉錄體分析結果顯示，*Rboh*、*COI1* 及 *MKK* 都於接種後表現量上升；*HSP* 則是表現下降；而 *CDPK* 與 *CAM/CML* 則呈現波動的表現。

再利用 BioLayout Express3D，將 SA0423 突變體專一表現轉錄子，依表現情形可分成 942 群，有 256 群在 SA0423 與 ‘TNG67’ 間呈現相反的表現趨勢。由於多數的轉錄子被註解為轉位子、逆轉位子及未知功能的蛋白質，因而剔除這些功能未知的基因群組，結果發現僅有 18 個群組，包含有參與生理代謝的轉錄子。再依據它們被註解的生化功能，從而篩選獲得 13 個可能與抗性相關的轉錄子。

將上述篩選模式所發現的 59 個抗性相關的轉錄子，利用即時定量逆轉錄聚合酶鏈鎖反應 (real-time RT-PCR) 再次分析這些基因在接種後的表現情形，發現其中 17 個轉錄子的表現與微晶片相符 (圖 4、表 3)，利用文獻檢索探討這些基因與植物免疫反應的關聯性。目前已知的植物免疫系統，主要分為 3 大部分：病原相關分子型式 (microbe/pathogen-associated molecular patterns, MAMP) 的辨識、病原菌

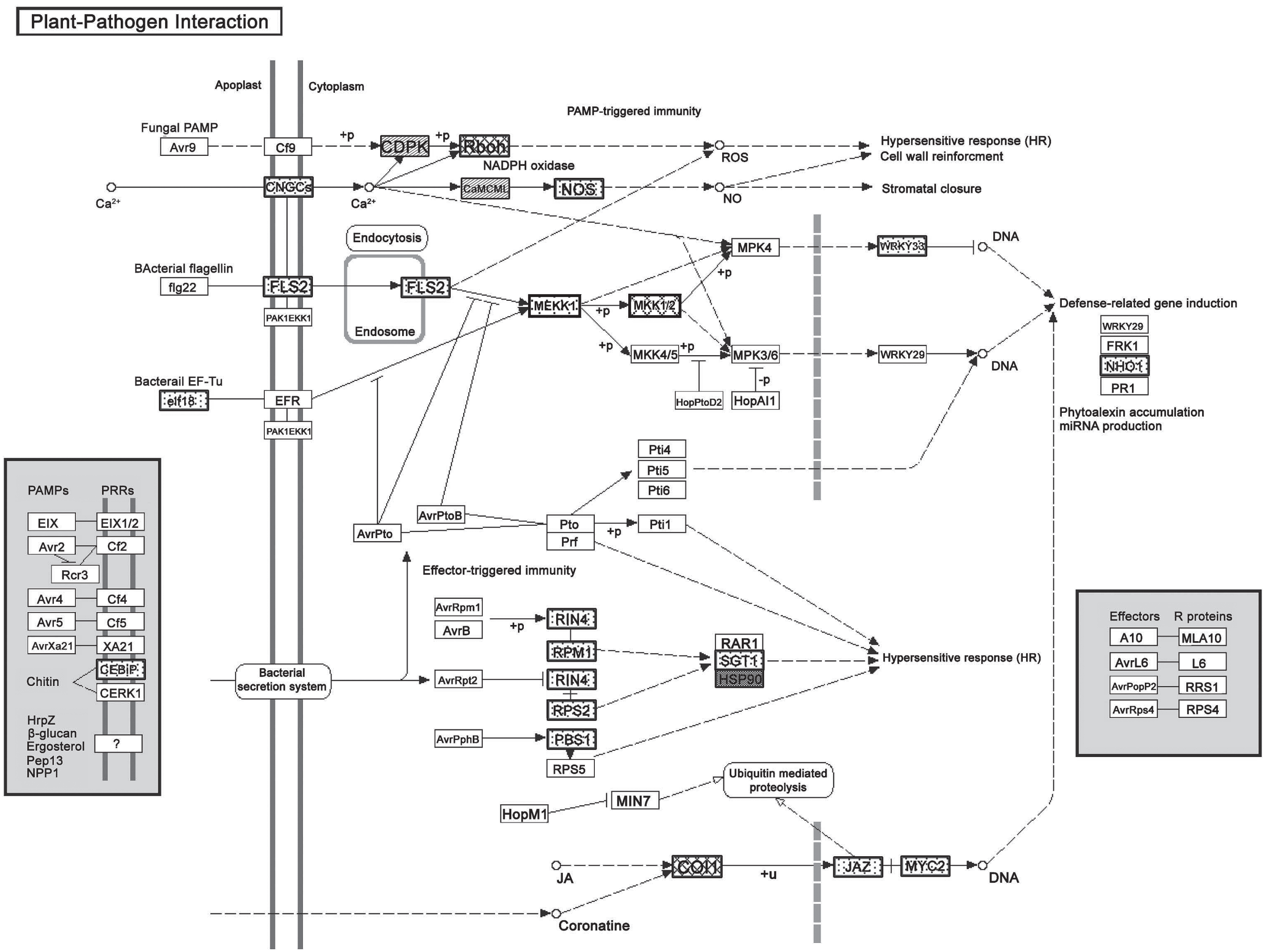

圖 3. 參與水稻「植物-病原菌交互作用」之代謝路徑 (KEGG Web site, osa04626) 之 SA0423 突變體專一差異性表現的轉錄子 (表示感染後表現量上升； 表示感染後表現量下降； 表示感染後表現量有波動； 表示未比對到差異基因)。

Fig. 3. The differentially expressed transcripts of the bacterial blight resistance mutant SA0423 involved in the "plant-pathogen interaction" pathway of rice (KEGG Web site, osa04626). Up-regulated genes: ; down-regulated genes: ; fluctuated genes: ; no matched genes: .

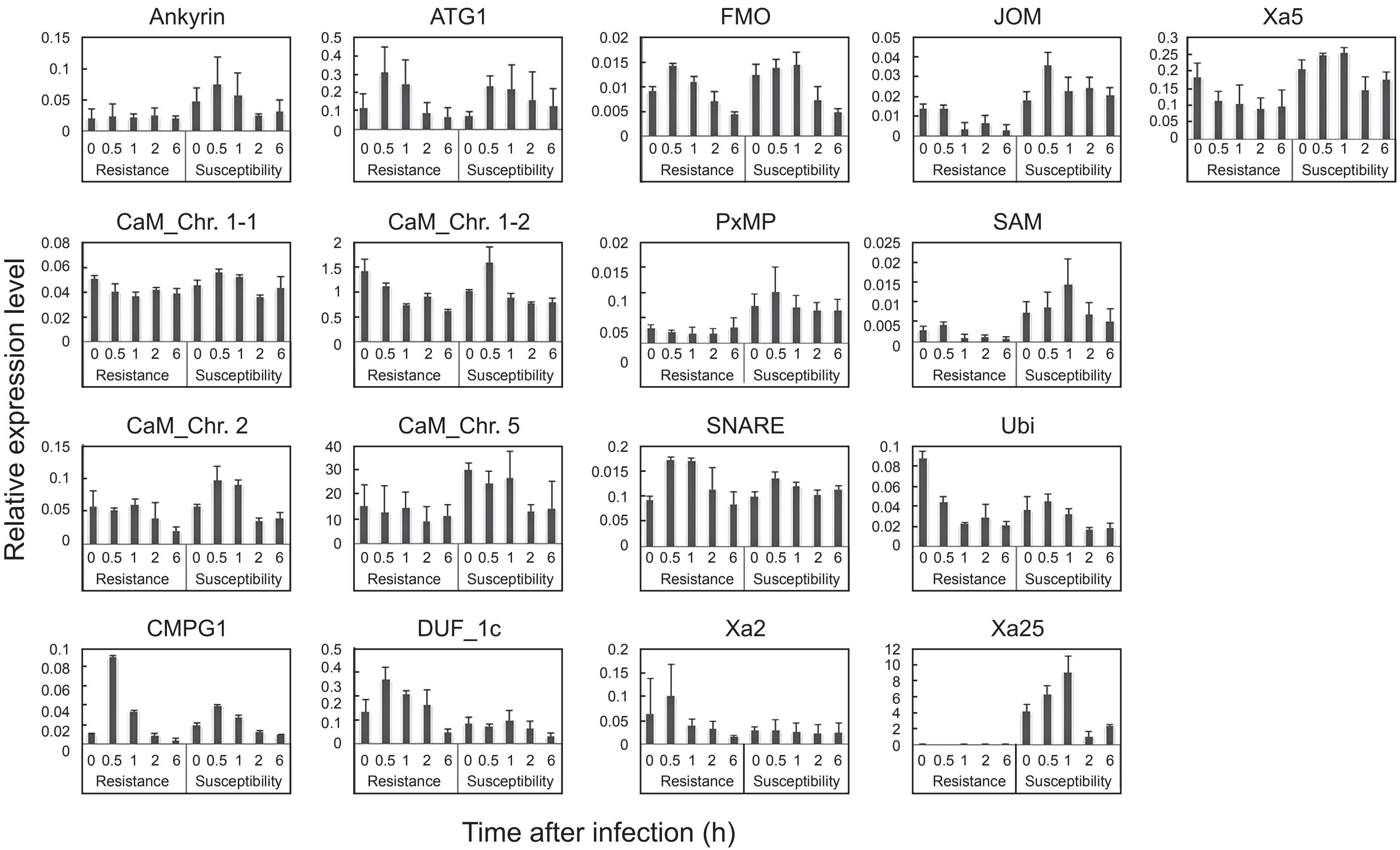

圖 4. 抗性候選基因之即時定量 RT-PCR 分析。

Fig. 4. Real-time RT-PCR analysis of the candidate resistance genes.

表 **3.** 本研究篩選所得之抗性候選基因。

Table 3. The resistance gene candidates screened in this study.

Gene name		Gene ontology
Ankyrin, Ankyrin repeat-rich protein	BP[z]	Cellular process, biosynthetic process, protein modification process, post-embryonic development, anatomical structure morphogenesis, response to endogenous stimulus
	MF	Binding, protein binding, catalytic activity,
ATG1, ATG1	BP	Cellular process, cellular component organization, protein modification process
	CC	Plasma membrane
	MF	Molecular_function
CaM_Chr.1-1, OsCam1-3- Calmodulin	BP	Biological_process, response to abiotic stimulus, post-embryonic development, signal transduction
	MF	Binding, protein binding
CaM Chr.1-2, OsCam3- Calmodulin	BP	Biological_process, response to abiotic stimulus, post-embryonic development, signal transduction
	MF	Binding, protein binding
CaM_Chr.2, EF hand family protein	BP	Protein modification process, biosynthetic process
	CC	Cytoplasm
	MF	Binding
CaM_Chr.5, OsCam2- Calmodulin	BP	Signal transduction
	CC	Plasma membrane
	MF	Signal transducer activity, binding, protein binding
CMPG, Immediate-early fungal elicitor protein CMPG1	BP	Protein modification process, biological_process
	CC	Intracellular
	MF	Catalytic activity, binding
DUF26, Domain of Unknown Function 26-lc	BP	Protein modification process, cellular process, metabolic process
	CC	Plasma membrane
	MF	Kinase activity, protein binding, cellular process,
FMO, Flavin-containing monooxygenase family protein	BP	Cell death, signal transduction, metabolic process, response to biotic stimulus, cellular process, response to stress
	CC	Endoplasmic reticulum, membrane, cell
	MF	Nucleotide binding, catalytic activity, binding
JOM, Jasmonate O-methyltransferase	BP	Multicellular organismal development, cellular process, metabolic process
	CC	Cellular_component
	MF	Binding, protein binding, transferase activity
PxMP, Peroxisomal membrane protein	BP	Biological_process
	CC	Peroxisome, membrane
	MF	Molecular_function
SAM, SAM dependent carboxyl methyltransferase	BP	Biological_process, cellular process, metabolic process
	CC	Cellular_component
	MF	Transferase activity
SNARE, SNARE associated Golgi protein	CC	Cytosol
Ubi, Ubiquitin family protein	MF	Molecular_function

表 3. 本研究篩選所得之抗性候選基因 (續)。

Table 3. The resistance gene candidates screened in this study. (continued)

Gene name	Gene ontology	
Xa2, OsSAUR21—Auxin-responsive SAUR gene family member	BP	Response to endogenous stimulus
	MF	Molecular_function
Xa25, Nodulin MtN3 family protein	BP	Biological_process, cellular process, transport
	CC	Plasma membrane, membrane, cell
	MF	Transporter activity
xa5, Transcription initiation factor IIA gamma chain	BP	Biosynthetic process, nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process
	CC	Nucleoplasm

[z] BP: biological_process; CC: cellular_component; MF: molecular_function.

effector 蛋白質的分泌與辨識及植物宿主內部荷爾蒙生合成及生理調節 (Panstruga *et al*. 2009)。而本次轉錄體分析結果發現，*CaM* 及 SNARE associated Golgi protein (*SNARE*) 可能參與在「MAMP 的辨識」機制。當植物細胞受到病原菌攻擊時，會快速累積鈣離子，誘導 CaM 的產生，進而啟動後續免疫系統的防禦基因 (Poovaiah *et al*. 2013)。SNARE 是一種多功能的跨膜蛋白質，可能藉由改變細胞壁組成份及提供抗性蛋白質等機制，抵抗病原菌入侵 (Bassham & Blatt 2008)。另一方面，flavin-containing monooxygenase family protein (*FMO*) (Schlaich 2007)、jasmonate O-methyltransferase (*JOM*)、peroxisomal membrane protein (*PxMP*)、SAM dependent carboxyl methyltransferase (*SAM*) (Loake & Grant 2007) 及 *Xa2* (Ghanashyam & Jain 2009) 等基因，可能參與「植物荷爾蒙生合成」。

從病原菌感染至細胞內訊號傳遞等一連串的免疫反應過程，泛素化 (ubiquitination) 扮演關鍵的角色。而泛素化過程主要受 3 種酵素的調控，包括泛素活化酶 (ubiquitin-activating enzyme, *E1*)、泛素結合酶 (ubiquitin-conjugating enzyme, *E2*) 及泛素連接酶 (ubiquitin ligase, *E3*) (Furlan *et al*. 2012)。抗性相關之差異表現轉錄子 ankyrin，經由蛋白質序列比對的分析發現與阿拉伯芥的 *E3* 具有高達 76% 的相似度，顯示它們可能有類似的生理功能。在阿拉伯芥的研究發現，*E3* 負調控乙烯的生合成 (Lyzenga *et al*. 2012)。因此，水稻的 ankyrin 有可能參與乙烯生合成的調控。

我們利用上述的蛋白質序列比對模式，結合文獻檢索，進行其他抗性相關之差異表現轉錄子的功能預測及註解發現，*ATG1* 可能與細胞的自噬作用 (autophagy) 有關，參與誘導受感染區域的細胞死亡，避免病原菌持續入侵 (Zhou *et al*. 2014)。而 DUF26 是植物細胞中 15 種受體蛋白激酶 (receptor protein kinase) 家族的一員，在阿拉伯芥的研究顯示，受病原菌的感染、活化氧族 (reactive oxygen species, ROS) 及水楊酸等誘導，可能參與在植物認知 (plant perception) 及逆境反應等訊息傳導路徑 (Czernic *et al*. 1999; Du & Chen 2000)。

結論

本研究針對具優良白葉枯病抗性之 SA0423 突變體，利用微晶片分析技術，探討其接種病原菌後轉錄體的變化，分析所得之差異表現轉錄子，利用 GO 註解來探索其所參與的代謝路徑，發現 SA0423 突變體專一表現轉錄子，可能參與胺醣 (amino sugar)、核苷酸醣 (nucleotide sugar)、乙醛酸鹽 (glyoxylate)、二羧酸鹽 (dicarboxylate) 及胺基酸 (alanine、aspartate、glutamate、arginine 及 proline)、甘油磷脂 (glycerophospholipid) 及維生素 B1 (thiamine) 等代謝路徑。其中，維生素 B1 可能誘導植物的系統獲得抗性 (systemic ac-

quired resistance; SAR) (Ahn *et al*. 2005)。接著利用「是否可能與抗性機制相關」及「是否受接種所誘導表現」作為篩選原則，探索差異表現轉錄子是否參與 SA0423 突變體的抗性機制，以「已知抗性基因座的比對」、「已知『植物－病原菌交互作用』代謝路徑的比對」及「BioLayout Express3D 表現分群」等 3 種生物資訊學的分析方法，發現 59 個差異表現轉錄子可能與 SA0423 突變體的抗性機制有關。再以 real-time RT-PCR 確認基因表現，發現有 17 個候選基因可能參與 SA0423 的抗性。最後，利用「蛋白質序列比對」及「文獻檢索」，進行這 17 個候選基因的功能預測及註解，以探討其與抗病的關聯性，結果發現 *CaM* 及 *SNARE* 可能參與在已知「植物-病原菌交互作用」代謝路徑；而 *FMO*、*JOM*、*PxMP*、*SAM*、*Xa2* 及 *ankyrin* 等基因，則可能參與「植物荷爾蒙生合成」；*ATG1* 可能與細胞的自噬作用有關；*DUF26* 可能參與免疫機制啟動前的訊息傳遞路徑。

這些結果顯示，本研究所建立生物資訊學的篩選模式，具有極佳的篩選效率，可快速、有效地自轉錄體分析結果，篩選出可能的抗性功能基因。未來這些基因將以功能分析確認其在 SA0423 的抗性機制中所扮演的角色，冀能開發 eQTL 分子標誌以應用於白葉枯病抗性的分子育種。

引用文獻

Ahn, I. P., S. Kim, and Y. H. Lee. 2005. Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. Plant Physiol. 138:1505–1515.

Bai, H., L. Y. Li, and G. Z. Liu. 2006. Advances of rice bacterial blight disease resistance gene *Xa21*. Yi Chuan 28:745–753. (in Chinese)

Bassham, D. C. and M. R. Blatt. 2008. SNAREs: Cogs and coordinators in signaling an development. J. Plant Physiol. 147:1504–1515.

Bogdanove, A. J., S. Schornack, and T. Lahaye. 2010. TAL effectors: Finding plant genes for disease and defense. Curr. Opin. Plant. Biol. 13:394–401.

Chirgwin, J. M., A. E. Przybyla, R. J. MacDonald, and W. J. Rutter. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry 18:5294–5299.

Chu, Z., M. Yuan, J. Yao, X. Ge, B. Yuan, C. Xu, X. Li, B. Fu, Z. Li, J. L. Bennetzen, Q. Zhang, and S. Wang. 2006. Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. Genes Dev. 20:1250–1255.

Czernic, P., B. Visser, W. Sun, A. Savoure, L. Deslandes, Y. Marco, M. Van Montagu, and N. Verbruggen. 1999. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* receptor-like protein kinase gene activated by oxidative stress and pathogen attack. Plant J. 18:321–327.

Du, L. and Z. Chen. 2000. Identification of genes encoding receptor like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. Plant J. 24:837–847.

Furlan, G., J. Klinkenberg, and M. Trujillo. 2012. Regulation of plant immune receptors by ubiquitination. Front. Plant Sci. 3:1–6.

Ghanashyam, C. and M. Jain. 2009. Role of auxin-responsive genes in biotic stress responses. Plant Signal. Behav. 4:846–848.

Gnanamanickam, S. S., V. B. Priyadarisini, N. N. Narayanan, P. Vasudevan, and S. Kavitha. 1999. An overview of bacterial blight disease of rice and strategies for its management. Curr. Sci. 77:1435–1443.

Gu, K., B. Yang, D. Tian, L. Wu, D. Wang, C. Sreekala, F. Yang, Z. Chu, G. L. Wang, and F. F. White. 2005. *R* gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. Nature 435:1122–1125.

Hsieh, S. P. Y. 2003. Rice bacterial blight. p.317–338. *in*: Plant Protection Illustrations 8: Rice Protection (Cheng, C. H. ed.) Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quaratine, Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei. 550 pp. (in Chinese)

Huang, N., E. R. Angeles, J. Domingo, G. Magpantay, S. Singh, G. Zhang, N. Kumaravadivel, J. Bennett, and G. S. Khush. 1997. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: Marker-assisted selection using RFLP and PCR. Theor. Appl. Genet. 95:313–320.

Iyer, A. S. and S. R. McCouch. 2004. The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. Mol. Plant Microbe Interact. 17:1348–1354.

Jiang, G. H., Z. H. Xia, Y. L. Zhou, J. Wan, D. Y. Li, R. S. Chen, W. X. Zhai, and L. H. Zhu. 2006. Testifying the rice bacterial blight resistance gene *xa5* by genetic complementation and further analyzing *xa5* (*Xa5*) in comparison with its homolog TFIIAγ1. Mol. Genet. Genom. 275:354–366.

Kauffman, H. E., A. P. K. Reddy, S. P. Y. Hsieh, and S. D. Merca. 1973. An improved technique for evaluation

resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. Plant Dis. Rep. 57:537–541.

Khush, G. S., D. J. Mackill, and G. S. Sidhu. 1989. Breeding rice for resistance to bacterial blight. p.207–217. *in*: Bacterial Blight of Rice. International Rice Research Institute. Manila. 235 pp.

Kottapalli, K. R., N. Sarla, and S. Kikuchi. 2006. In silico insight into two rice chromosomal regions associated with submergence tolerance and resistance to bacterial leaf blight and gall midge. Biotechnol. Adv. 24:561–589.

Lee, S. W., M. Han, C. J. Park, Y. S. Seo, L. E. Bartley, and J. S. Jeon. 2011. The molecular mechanisms of rice resistance to the bacterial blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*. Bot. Res. 60:52–87.

Lee, S. W., S. W. Han, M. Sririyanum, C. J. Park, Y. S. Seo, and P. C. Ronald. 2009. A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity. Science 326:850–853.

Lin, X. H., D. P. Zhang, Y. F. Xie, H. P. Gao, and Q. Zhang. 1996. Identifying and mapping a new gene for bacterial blight resistance in rice based on RFLP markers. Phytopathology 86:1156–1159.

Loake, G. and M. Grant. 2007. Salicylic acid in plant defence–the players and protagonists. Curr. Opin. Plant Biol. 10:466–472.

Lyzenga, W. J., J. K. Booth, and S. L. Stone. 2012. The arabidopsis ring-type E3 ligase XBAT32 mediates the proteasomal degradation of the ethylene biosynthetic enzyme, 1-aminocyclopropanae-1carboxylate synthase7. Plant J. 71:23–34.

Mew, T. W., C. M. Vera Cruz, and E. S. Medalla. 1992. Changes in race frequency of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in response to the planting of rice cultivars in Philippines. Plant Dis. 76:1029–1032.

Nino-Liu, D. O., P. C. Ronald, and A. J. Bogdanove. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: Model pathogens of a model crop. Mol. Plant Pathol. 7:303–324.

Panstruga, R., J. E. Parker, and P. Schulze-Lefert. 2009. SnapShot: Plant immune response pathways. Cell 136:978e1–978e3.

Poovaiah, B. W., L. Du, H. Wang, and T. Yang. 2013. Recent advances in calcium/calmodulin mediated signaling with an emphasis on plant-microbe interactions. J. Plant Physiol. 163:531–542.

Sama, V. S., N. Rawat, R. M. Sundaram, K. Himabindu, B. S. Naik, B. C. Viraktamath, and J. S. Bentur. 2014. A putative candidate for the recessive gall midge resistance gene *gm3* in rice identified and validated. Theor. Appl. Genet. 127:113–124.

Schlaich, N. L. 2007. Flavin-containing monooxygenases in plants: Looking beyond detox. TRENDS Plant Sci. 12:412–418.

Shanti, M. L., V. V. Shenoy, G. L. Devi, V. M. Kumar, P. Premalatha, G. N. Kumar, H. E. Shashidhar, U. B. Zehr, and W. H. Freeman. 2010. Marker-assisted breeding for resistance to bacterial leaf blight in popular cultivar and parental lines of hybrid rice. J. Plant Pathol. 92:495–501.

Song, W. Y., G. L. Wang, L. L. Chen, H. S. Kim, L. Y. Pi, T. Holsten, J. Gardner, B. Wang, W. X. Zhai, L. H. Zhu, C. Fauquet, and P. Ronald. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. Science 270:1804–1806.

Sun, X., Y. Cao, Z. Yang, C. Xu, X. Li, S. Wang, and Q. Zhang. 2004. *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. Plant J. 37:517–527.

Theocharidis, A., S. van Dongen, A. J. Enright, and T. C. Freeman. 2009. Network visualization and analysis of gene expression data using BioLayout Express (3D). Nat. Protoc. 4:1535–1550.

Wang, C. S., T. H. Tseng, and C. Y. Lin. 2002. Rice biotech research at the Taiwan Agricultural Research Institute. Asia Pacific Biotech. News 6:950–956.

Wang, C. S., A. Z. Wang, and D. G. Lin. 2013. The application of mutants in breeding disease resistance in rice. *in*: Special Issue or the Symposium on Important Crop Pathogen Detection and Management. (Wang, A. Z., C. S. Wang, P. J. Ann, Z. X. Yu, and H. S. Wu, eds.) Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan. Taichung. 193 pp. (in Chinese with English abstract)

Xiang, Y., Y. Cao, C. Xu, X. Li, and S. Wang. 2006. *Xa3*, conferring resistance for rice bacterial blight and encoding a receptor kinase-like protein, is the same as *Xa26*. Theor. Appl. Genet. 113:1347–1355.

Yang, Z., X. Sun, S. Wang, and Q. Zhang. 2003. Genetic and physical mapping of a new gene for bacterial blight resistance in rice. Theor. Appl. Genet. 106:1467–1472.

Yoshimura, S., U. Yamanouchi, Y. Katayose, S. Toki, Z. X. Wang, I. Kono, N. Kurata, M. Yano, N. Iwata, and T. Sasaki. 1998. Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. Proc. Natl. Acad. Sci USA 95:1663–1668.

Zhang, Q. 2007. Strategies for developing Green Super Rice. Proc. Natl. Acad. Sci USA 104:16402–16409.

Zhou, J., J. Q. Yu, and Z. Chen. 2014. The perplexing role of autophagy in plant innate immune responses. Mol. Plant Pathol. 15:637–645.

Transcriptomic Analysis of a Resistant Mutant in Response to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Infection

Chiao-Yi Huang[1], Szu-Yi Chou[2], Ya-Lin Lee[3], Wen-Bin Tseng[1], Chun-Wei Chen[4], Chang-Sheng Wang[5,*], and Da-Gin Lin[6,*]

Abstract

Huang, C. Y., S. Y. Chou, Y. L. Lee, W. B. Tseng, C. W. Chen, C. S. Wang, and D. G. Lin. 2015. Transcriptomic analysis of a resistant mutant in response to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* infection. J. Taiwan Agric. Res. 64(2):145–158.

Bacterial blight disease, caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, is one of the most serious diseases in rice. To explore novel resistant genes in SA0423, harbored with broadly resistance against rice bacterial blight disease (RBBD), the transcriptomes of 'TNG67' and SA0423 were determined by microarray technologies with the RNA samples prepared from the leaves collected at 0, 0.5, 1, 2, and 6 h, respectively, after inoculation of XF89b, atypical isolate used in Taiwan nursery. One-way analysis of variance and Student-Newman-Keuls (SNK) test displayed that 2,727, 3,585, and 18,432 differentially displayed transcripts were found only in SA0423, 'TNG67', and both lines, respectively. Fifty-nine genes that might involve in providing the resistance in SA0423 were determined by bioinformatics analysis such as annotation of metabolic pathway, comparative mapping analysis with published resistance loci, "plant-pathogen interaction" pathway, and clustering with BioLayout Express3D. By confirming with real-time RT-PCR, 17 resistance gene candidates were selected in this work. Through bioinformatic analysis, results showed that they might be involved in the published "plant-pathogen interaction" pathway, biosynthetic pathway of plant hormones, autophagy and signal transduction before the plant immune system was induced. The function of these candidates will be further defined to understand the resistance mechanism of SA0423 and to develop eQTL and/or SSR markers to apply in marker-assisted selection for improving disease resistance.

Key words: Rice, Bacterial blight disease, Resistance, Mutant, Transcriptomes.

Received: August 6, 2014; Accepted: January 17, 2015.
[*] Corresponding authors, email: wangchansen@nchu.edu.tw and dagin@tari.gov.tw
[1] Research Assistants, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
[3] Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[5] Professor, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
[6] Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(2):159–166 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06402.08

研究簡報

萵苣嵌紋病毒之多元抗血清製作與應用

曹麗玉 [1,*] 林照能 [2]

摘要

曹麗玉、林照能。2015。萵苣嵌紋病毒之多元抗血清製作與應用。台灣農業研究 64(2):159–166。

引起嵌紋、皺葉病徵的萵苣樣品接種至紅藜、白藜等病毒指示植物，經過生物分析、寄主範圍測試、病斑特性觀察及血清學等證據顯示，病因為萵苣嵌紋病毒 (*Lettuce mosaic virus*; LMV)。以人工方式接種單斑系病毒於 7 科 27 種植物，其中萵苣、菠菜、豌豆及圓葉菸草均產生系統性嵌紋病徵，奎藜表現系統性黃化斑點病徵，紅藜及千日紅則出現局部壞疽斑點病徵，其餘供試植株均未出現病徵。利用聚丙烯醯胺膠體電泳分離出病毒鞘蛋白 (35 KDa) 作為免疫源，注射白兔製作 LMV 抗血清。以間接酵素連結免疫抗體吸附分析法 (indirect -ELISA) 進行血清最適稀釋濃度評估，抗血清稀釋濃度可達5,000 倍，以此濃度偵測罹病植株粗汁液，病葉汁液稀釋倍數靈敏度可達 1/640 倍。檢測市售 10 批商業品種萵苣種子及 7 批種苗，LMV 檢出率分別介於 0–28% 及 0–13.3%。調查雲林縣麥寮鄉的結球萵苣產區，隨機檢測疑似罹病萵苣 113 株，LMV 病毒檢出率達 37%。

關鍵詞：萵苣、萵苣嵌紋病毒、血清、檢測。

前言

萵苣 (*Lactuca sativa* L.) 屬菊科 (Compositae) 作物，為重要的蔬菜種類之一，台灣近年來隨著消費型態改變，萵苣在生菜中佔有重要地位，消費量逐年增加。根據 2013 年農糧署農業統計年報資料顯示，全台萵苣種植面積達 2,986 ha，年產量約 54,334 Mg，主要產區以雲林縣 (二崙、崙背、西螺及麥寮) 為主，新北市與桃園縣次之。可危害萵苣的病毒種類至少有 15 種以上 (Davis *et al*. 2003)，其中又以萵苣嵌紋病毒 (*Lettuce mosaic virus*; LMV) 為萵苣生產限制因子之一 (Dianant & Lot 1992; Krause-Sakate *et al*. 2002; Davis *et al*. 2003; German-Retana *et al*. 2008; Soleimani *et al*. 2011)。萵苣嵌紋病毒屬於馬鈴薯 Y 病毒屬 Potyvirus (King *et al*. 2011)，可經由蚜蟲及種子傳播 (Broadbent *et al*. 1951; Couch 1955; Nobel & Richardson 1968; Le-Gall 2003)，透過國際間種子交流與販售，分佈遍及全球萵苣栽培地區。感染 LMV 之萵苣，病徵會因植株品種、品系、感染病毒系統不同而有所差異 (Ainsworth & Ogilvie 1939; Grogan *et al*. 1952; Tomlinson 1962; Tomlinson 1970; Krause-Sakate *et al*. 2002; German-Retana *et al*. 2008; Soleimani *et al*. 2011)，主要產生嵌紋、皺葉、矮化等症狀，有時在葉片、中肋及莖部產生壞疽性斑點，嚴重危害時會導致種子減產 (Tomlinson 1962; Nobel & Richardson 1968)。

LMV 在自然界中可感染 9 科 24 種植物，其中萵苣、豌豆 (*Pisum sativum* L.)、菠菜 (*Spinacia oleraceae* L.) 為經濟作物；人工接種則可感染 16 科 121 種植物 (Dianant & Lot 1992)。罹病之萵苣會因品種 (Grogan *et al*.

投稿日期：2014 年 9 月 12 日；接受日期：2014 年 12 月 27 日。
[*] 通訊作者：tsly@fthes-tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 高雄市。
[2] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所蔬菜系助理研究員。台灣 高雄市。

1952; Tomlinson 1970)、植株感染株齡 (Couch 1955) 或環境因子之不同，造成種子帶毒率有程度上之差異 (0–16%) (Neergard 1979; Dianant & Lot 1992)。為避免本病毒經由種子傳播，LMV 已被列為國際間萵苣種子進出口的重要檢疫對象 (Dianant & Lot 1992)。LMV 的檢測，包括早期的指示植物病徵觀察 (Marrou & Messiaen 1967)、病組織切片觀察 (Edwardson 1992; Hunter & Bowyer 1993) 及血清學的應用等 (如酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA) (Jafarpour *et al*. 1979; Falk & Purcifull 1983; Candresse *et al*. 2007)、放射線免疫吸附分析 (RISA) (Ghabrial & Shepherd 1982)、酵素連結螢光分析 (ELFA) (Dolores-Talens *et al*. 1989)、免疫吸附電子顯微鏡技術 (ISEM) (Brlansky & Derrick 1979) 等技術。

材料與方法

本試驗之萵苣嵌紋病毒係採集自具明顯嵌紋、皺葉之葉萵苣樣品 (*Lactuca sativa var. crispa* L.)，加入 10× (W/V) 體積 0.1 M 磷酸鈉緩衝液 (Na-phosphate buffer, pH 7.4, 含 1% Na_2SO_3)，以手動研磨器或研缽磨碎葉片，粗汁液磨擦接種於灑有 400 mesh 金鋼砂之奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 或紅藜 (*Chenopodium amaranticolor* Coste and Reyn.)，於接種後 10–14 d 切取黃化單斑，經過 3 次單斑分離後回接至健康之萵苣及圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana* Domin)，得到 7 個單斑病毒株 (1-3-1、2-2-1、1-3-4、5-2-5、2-3-2-1、3-3-2、3-2-1-1、4-3-3、4-3-2-4)。本試驗則以單斑系編號 3-2-1-1 為病毒接種及純化來源，並以圓葉菸草做為病毒繁殖寄主及後續試驗之病毒接種來源。

單斑分離後之萵苣病毒依前述方法接種於莧科 (Amaranthaceae)、藜科 (Chenopodiaceae)、菊科 (Compositae)、十字花科 (Cruciferae)、葫蘆科 (Cucurbitaceae)、豆科 (Leguminosae) 及茄科 (Solanaceae) 等 7 科 27 種植物 (表 1)，其中萵苣、菠菜、豌豆及圓葉菸草產生系統性嵌紋病徵，奎藜則表現系統性局部黃化斑點病徵，紅藜及千日紅則為局部之壞疽斑點病徵，其餘供試植株均未產生任何病徵。萵苣於接種後 10 d 陸續出現葉脈透化、葉片嵌紋、黃化之系統性病徵，菠菜、豌豆葉片則出

表 1. 萵苣嵌紋病毒於供試植物上之病徵表現。

Table 1. Symptoms of plants inoculated with *Lettuce mosaic virus*.

Test plant	Reaction[z]
Amarnthaceae	
Amaranthus mangostanus	–
Gomphrena globosa	L.L.
Chenopodiaceae	
Chenopodium amaraticolor	L.L.
Chenopodium quinoa	L.L./S
Spinacia oleracea	M/S
Compositae	
Lactuca sativa L.	M/S
Cruciferae	
Brassica campestris L.	–
Brassica campestris var. *chinensis*	–
Brassica oleraceae var. *botrytis*	–
Brassica oleraceae var. *capitata*	–
Brassica pekinensis	–
Raphanus sativus	–
Cucurbitaceae	
Citrullus vulgaris	–
Cucumis melo	–
Cucumis sativus	–
Cucurbita moschata	–
Luffa aegyptiaca	–
Leguminosa	
Phaeseolus vulgaris	–
Pisum sativum	M/S
Vigna unguiculata “Black Eye”	–
Solanaceae	
Capsicum annuum L.	–
Datura stramonium	–
Lycopersicon esculentum	–
Nicotiana benthamiana	M/S
Nicotiana glutinosa	–
Nicotiana rustica	–
Nicotiana tabacum cv. Van Hicks	–

[z] L.L.: local lesion; M: mosaic; S: systemic infection; –: no infection.

現黃綠相間之嵌紋病徵，葉片明顯變小，植株矮化。圓葉菸草於接種後 10 d 陸續出現葉色黃化、葉片捲曲、葉片嵌紋之系統性病徵。奎藜接種葉於 10–14 d 出現直徑 1–2 mm 之黃色局部病斑，接種葉下方之未接種葉及上方之新生葉亦散生黃色小斑，呈現系統性感染。紅藜接種葉於 10–14 d 出現直徑 1–2 mm 之黃色局部病斑，後擴大約 3–4 mm 並轉為具有紅色外環之壞疽斑點。千日紅於接種後 7 d 出現褪色斑點，後期呈現暗紅色外環之壞疽斑點，無系統性轉移。其餘供試植株均未產生任何病徵，且回接至紅藜上亦無任何病斑產生，確認為非寄主 (Marrou & Messiaen 1967; Tomlinson 1970; Le-Gall 2003)。

病毒增殖及純化

修飾 Tomlinson (1970) 和 Moghal & Francki (1976) 之方法純化 LMV。取 *Nicotiana benthamiana* 接種約 14–20 d 之病組織 200 g 放入 Waring blender，加入 2 倍 (W/V) 體積之 0.25 M 磷酸鉀緩衝液 (K-P buffer, pH 7.5) (內含 0.01 M EDTA，0.1% Na_2SO_3)，打碎後以兩層紗布過濾，濾液分別加入等體積 (W/V) 氯仿及四氯化碳 (1：1)，再低速攪拌約 1 min 後，低速離心 10 min。上層液加入 Triton X-100 至 1%，於低溫中攪拌約 30 min，低速離心 10 min。取上清液緩慢加入墊有 5 mL 20% 蔗糖水溶液的離心管中，以 166,800× *g* (Hitachi RP 50-2 rotor) 離心 60 min。沉澱物以 22 mL 0.05 MK-P buffer, pH 7.5 懸浮 (並以玻璃均質器溶浮均勻)，於低溫中攪拌約 30 min，離心 10 min。上清液加入硫酸銫 (最終濃度為 30%) 攪拌均勻後，以 213,000× *g* (Hitachi RPS 40T rotor) 進行硫酸銫等密度梯度離心 16 h。觀察有無病毒條帶，如有白色霧狀帶，則以玻璃吸管吸取病毒條帶及附近液體，置入透析袋內以 0.01 M K-P buffer (pH 7.5) 透析 2 次，間隔約 2 h。低速離心 5 min (去除雜質)，分別將病毒原液及稀釋 10 倍病毒液以分光光度計測量 A_{260}、A_{280}、A_{320} 後，並以 E (0.1%, 1 cm, 260_{nm}) = 2.4 為定量標準 (Lecoq & Pitrat 1985)。經過一系列的低、高速離心、20% 蔗糖墊及 30% 硫酸銫等密度梯度離心後，距離心管液面約 5–6 cm 處可見白色薄霧狀病毒帶，此為病毒存在處。以玻璃吸管收集病毒液，並以 K-P buffer 透析去除硫酸銫重金屬後，病毒原液以 E (0.1%, 1 cm, 260 nm) = 2.4 為病毒定量標準。經分光光度計 spectrophotometer 測量 A260/A280 約為 1.12。每 100 g 圓葉菸草病葉之病毒收量約 1.27 mg。

抗血清之製備

以電子顯微鏡觀察病毒濃縮液時雖然背景雜質不多，但以 SDS-PAGE 分析病毒鞘蛋白分子量大小時，除於 35 KDa 附近有病毒蛋白鞘分子條帶外，67 KDa 附近仍有疑似植物成分之蛋白帶，故參考 Laemmli (1970) 之方法，利用十二烷基硫酸鈉 - 聚丙烯醯胺膠體電泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) 分離純化萵苣嵌紋病毒鞘蛋白分子為免疫源，委託濁水溪生物科技股份有限公司代工，以肌肉注射方式施打於紐西蘭白兔 (大小約 2 kg)，每 10–14 d 注射 1 次，連續注射 6 次。第 1 次注射之病毒鞘蛋白 (200 ug mL^{-1}) 以等量 (V/V) 之完全佐劑 (Freund's complete adjuvant) 乳化後注射，中間 4 次均以不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant) 乳化病毒鞘蛋白 (100 ug mL^{-1})，最後 1 次注射則完全不加佐劑。注射第 6 針 7 d 後進行白兔心臟採血，所採兔血於 37℃水浴靜置 1 h，低速離心 20 min 後吸取上層血清，保存於 -70℃備用。

酵素連結免疫抗體分析

依 Koenig (1981) 之檢測步驟，進行上述抗血清之間接酵素連結免疫抗體分析，測試血清最適稀釋濃度。罹病菸草或萵苣葉片加 10 倍體積 (W/V) 之 coating buffer (1.59 g Na_2CO_3, 2.93 g $NaHCO_3$, 0.2 g NaN_3, 1 L H_2O, pH 9.6)，以手握式研磨器研磨，粗汁液低速離心 10 min 或靜置於 4℃冰箱。將上述汁液加入 96 穴之微量盤中 (每穴加 0.1 mL)，放入保濕盒中，置於 37℃定溫箱反應 4 h。取出微量盤並倒出液體，以 PBST 清洗 4 次。於每孔加入 0.2 mL 之 3% BSA (bovine serum albumin, 溶於 1/2 倍濃度的 coating buffer)，置於 37℃

定溫箱反應 2 h。微量盤清洗後加入以 conjugate buffer (2% PVP-40, 0.2% ovalbumin, 1 L PBST) 稀釋成不同濃度的血清，置於 37℃定溫箱反應 2 h。(並以購自 Agdia 公司之 LMV 抗體為反應對照) 以 PBST 清洗的微量盤加入以 conjugate buffer 稀釋成 5,000× 之抗體免疫球蛋白標識鹼性磷酸酵素 (goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate, Sigma)，每穴加 0.1 mL，置於 37℃定溫箱反應 2 h。微量盤清洗後於每孔中加入 100 μL 溶於 substrate buffer (97 mL diethanolamine, 800 mL H_2O, 0.16 g NaN_3, pH 9.8) 新鮮配製的 1 mg mL^{-1} 鹼性磷酸酵素基質 (*p*-nitrophenyl phosphate disodium, Sigma)，於 37℃反應 30 min，以 ELISA 判讀儀 (機型 Emax™) 測其 OD_{405nm} 之吸光值。

將自製 LMV 血清以 conjugate buffer 稀釋為 100×、500×、1,000×、2,000×、4,000×、5,000× 及 8,000× 不同濃度進行測試，並以 Agdia 公司販售之 LMV 抗體為對照。結果顯示本試驗自製之 LMV 血清稀釋 5,000× 就可達到與 Agdia 公司販售之 LMV 抗體相同的檢測效果 (表 2)。以十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳純化的萵苣嵌紋病毒鞘蛋白分子為免疫源，可減少抗血清與健康菸草及萵苣粗汁液產生假陽性反應 (Jafarpour *et al*. 1979; Falk & Purcifull 1983)。若以此濃度偵測罹病萵苣及圓葉菸草粗汁液，病汁液稀釋倍數靈敏度可達 1/640 倍 (圖 1)。

表 2. 以間接 ELISA 分析法測試 LMV 抗血清最適稀釋濃度。

Table 2. The optimal dilution of LMV antiserum for indirect-ELISA.

	anti-LMV					
Test sample[z]	8,000×	5,000×	4,000×	2,000×	1,000×	200× (Agdia)
Diseased-10 d	0.454	1.030	1.573	1.809	2.529	0.906
Healthy-tobacco	0.023	0.041	0.138	0.207	0.361	0.017
Healthy-lettuce	0.016	0	0.028	0.044	0.063	0.007

[z] Test plant: Diseased-10 d: the fresh leaf sample of *N. benthamiana* inoculated with LMV after 10 d; Healthy-tobacco: the fresh leaf sample of healthy *N. benthamiana*; Healthy-lettuce: the fresh leaf sample of healthy lettuce.

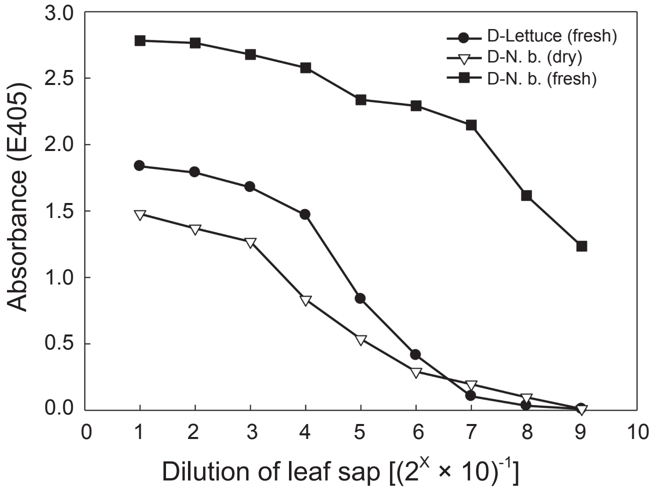

圖 1. 以 indirect-ELISA 及 LMV 抗血清測試罹病菸草及萵苣粗汁液可檢出之最高稀釋濃度 $[(2^x \times 10)^{-1}]$ 。

Fig. 1. Sap dilution end points of LMV-infected plant were estimated by LMV antiserum and indirect-ELISA $[(2^x \times 10)^{-1}]$.

抗血清應用

種子帶毒率檢查

收集 10 批商業品種萵苣種子，包括結球萵苣 *L. sativa* var. *capitata* L.、不結球萵苣 *L. sativa* var. *crisp* L. (平葉萵苣、皺葉萵苣) 及立生萵苣 *L. sativa* var. *romana* Hort.，每 10 顆種子加入 0.3 mL coating buffer 置於 4℃浸泡 2 h 後研磨，研磨液以低速離心 10 min，取 0.2 mL 上清液加入 96 孔穴微量盤 (每穴加 0.1 mL，共 2 穴)，利用上述間接酵素連結免疫分析法，以自製抗血清檢測萵苣種子之 LMV 帶毒率。根據檢測結果：僅有一批平葉萵苣種子未測出 LMV，其餘受檢測品種皆有程度不同的帶毒率，LMV 病毒檢出率介於 0–28% 之間 (表 3)。

穴盤苗帶毒率檢查

收集中部、南部市售萵苣種子，分別播種至 40 穴穴盤內，約 30 d 後約長出 3–4 片本葉後，採其展開葉片以上述間接酵素連結免疫分析法，及自製抗血清檢測萵苣種苗之 LMV 帶毒率。

檢測結果顯示：每品系皆有程度不同的 LMV 帶毒率，病毒檢出率介於 0–13.3% 之間 (表 4)。

萵苣產區田間調查

於 2012 年 11 月至 12 月調查雲林縣麥寮鄉結球萵苣產區病毒感染情形，隨機採集 113 株疑似罹病萵苣葉片，其中有 42 個檢測樣本對於 LMV 抗血清呈現陽性反應，LMV 病毒檢出率達 37% (42/113)。

表 3. 市售萵苣種子之萵苣嵌紋病毒帶毒檢定。

Table 3. Indexing of various seed lots of lettuce reacted with LMV antiserum in indirect ELISA.

Area	Lettuce variety	Percentage of seed contaminated (%)
Nantou	*Lactuca sativa* var. *capitata* L.	3
	L. sativa var. *capitata* L.	28
	Lactuca sativa var. *crispa* L.	5
Taichung	*L. sativa* var. *capitata* L.	8
	L. sativa var. *crispa* L.	11
Tainan	*L. sativa* var. *capitata* L.	13
	L. sativa var. *capitata* L.	7
Kaohsiung	*L. sativa* var. *capitata* L.	13
	L. sativa var. *crispa* L.	0
	Lactuca sativa var. *romana* Hort.	5

表 4. 間接 ELISA 分析法檢測不同萵苣品種幼苗之 LMV 感染率。

Table 4. Incidence of LMV on seedlings of various lettuce varieties (*Lactuca sativa* L.) detected by indirect ELISA.

Lettuce variety	Total sample	Incidence of LMV (%)
Ho-Yeh	108	2.8
Ching-Tsuey	102	9.8
Liu-Li	105	13.3
Tsuey-Yu	101	0
Chu-Yeh	114	10.5
Pao-Hsin	100	9.0
Hsia-Kuan	94	3.2

早期國外文獻顯示萵苣種子帶毒率若高於 0.1%，則本病害極可能很難防治 (Broadbent *et al*. 1951; Grogan *et al*. 1952; Tomlinson 1970)，若達 0.5% 帶毒率，再加上田間蚜蟲族群密度高，則可能導致全園無收成 (Zink *et al*. 1956; Neergard 1979)。美國官方已訂定萵苣種子帶有 LMV 之容許標準為 30,000 粒種子內不允許有一粒種子帶此病毒，而歐洲國家之容許標準則設定低於 0.1% (Dianant & Lot 1992)，才能又有效控制田間蔓延。由於使用無病毒種子對於預防萵苣嵌紋病有良好效果 (Grogan *et al*. 1952; Tomlinson 1962; Grogan 1980)，因此建議種苗生產公司與農民應建立無病毒種子篩檢制度，配合田間媒介昆蟲防治及其他肥培管理措施，應可有效降低本病之發生及其引起之農業損失。

引用文獻

Ainsworth, G. C. and L. Ogilvie. 1939. Lettuce mosaic. Ann. Appl. Biol. 26:279–297.

Brlansky, R. H. and K. S. Derrick. 1979. Detection of seed-borne plant viruses using serologically specific electron microscopy. Phytopathology 69:96–100.

Broadbent, L., T. W. Tinsley, W. Buddin, and E. T. Roberts. 1951. The spread of lettuce mosaic virus in the field. Ann. Appl. Biol. 38:689–706.

Candresse, T., H. Lot, S. German-Retana, R. Krause-Sakate, J. Thomas, S. Souche, T. Delaunay, M. Lanneau, and O. Le-Gall. 2007. Analysis of the serological variability of Lettuce mosaic virus using monoclonal antibodies and surface plasmon resonance technology. J. Gen. Virol. 88:2605–2610.

Couch, H. B. A. 1955. Studies on seed transmission of lettuce mosaic virus. Phytopathology 45:63–70.

Davis, R. M., K. V. Subbarao, R. N. Raid, and E. A. Kurtz. 2003. Compendium of Lettuce Diseases. APS Press. Pullman. 79 pp.

Dianant, S. and H. Lot. 1992. Lettuce mosaic virus. Plant Pathol. 41:528–542.

Dolores-Talens, A. C., J. H. Hill, and D. P. Durand. 1989. Application of enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) to detection of lettuce mosaic virus in lettuce seeds. J. Phytopathol. 124:149–154.

Edwardson, J. R. 1992. Inclusion bodies. p.25–30. *in*: Potyvirus Taxonomy. (Barnett, O. W., ed.) Archives of virology, Supplementum 5. Springer-Verlag/Wein. New York. 450 pp.

Falk, B. W. and D. E. Purcifull. 1983. Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test to index lettuce mosaic virus in Florida. Pant Dis. 67:413–416.

German-Retana, S., J. Walter, and O. Le-Gall. 2008. Lettuce mosaic virus: From pathogen diversity to host interactors. Mol. Plant Pathol. 9:127–136.

Ghabrial, S. A. and R. J. Shepherd. 1982. Radioimmunosorbent assay for detection of lettuce mosaic virus in lettuce seed. Plant Dis. 66:1037–1040.

Grogan, R. G. 1980. Control of lettuce mosaic with virus-free seed. Plant Dis. 64:446–449.

Grogan, R. G., J. E. Welch, and R. Bardin. 1952. Common lettuce mosaic and its control by the use of mosaic-free seed. Phytopathology 42:573–578.

Hunter, D. G. and J. W. Bowyer. 1993. Cytopathology of lettuce mosaic virus-infected lettuce seeds and seedlings. J. Phytopathol. 137:61–72.

Jafarpour, B., R. J. Shepherd, and R. G. Groban. 1979. Serological detection of bean common mosaic and lettuce mosaic viruses in seed. Phytopathology 69:1125–1129.

King, A. M. Q., M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz. 2011. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. San Diego. 1327 pp.

Koenig, R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 55:53–62.

Krause-Sakate, R., O. Le-Gall, H. Fakhfakh, M. Peypelut, M. Marrakchi, C. Varveri, M. A. Pavan, S. Souche, H. Lot, F. M. Zerbini, and T. Candresse. 2002. Molecular and biological characterization of Lettuce mosaic virus (LMV) isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. Phytopathology 92:563–572.

Laemmli, V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacterphage T4. Nature 227:680–685.

Lecoq, H. and M. Pitrat. 1985. Specificity of the helper-component-mediated aphid transmission of three potyviruses infecting muskmelon. Phytopathology 75:890–893.

Le-Gall, O. 2003. Lettuce mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. No. 399. (Jones, A. T., D. J. Robinson, N. Boonham, and R. Mumford, eds.) Rothamsted Research, UK. http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=399 (visit on 3/17/2010)

Marrou, J. and C. M. Messiaen. 1967. The *Chenopodium quinoa* test: A critical method for detecting seed

transmission of lettuce mosaic virus. Proc. Int. Seed Testing Assoc. 32:49–57.

Moghal, S. M. and R. I. B. Francki. 1976. Towards a system for the identification and classification of potyviruses: I. Serology and amino acid composition of six distinct viruses. Virology 73:350–362.

Neergard, P. 1979. Seed Pathology, Vol. I. The Macmillan Press. London. 839 pp.

Nobel, M. and W. J. Richardson. 1968. An Annotated List of Seed-borne Diseases. Phytopathological Paper 8. Commonwealth Mycological Institute. Norwich. 191 pp.

Soleimani, P., G. Mosahebi, and M. K. Habibi. 2011. Identification of some viruses causing mosaic on lettuce and characterization of *Lettuce mosaic virus* from Tehran province in Iran. Afr. J. Agric. Res. 6:3029–3035.

Tomlinson, J. A. 1962. Control of lettuce mosaic by the use of healthy seed. Plant Pathol. 11:61–64.

Tomlinson, J. A. 1970. Lettuce Mosaic Virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. No. 9. Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biology. Kew. 4 pp.

Zink, F. W., R. G. Grogan, and J. E. Welch. 1956. The effect of the percentage of seed transmission upon subsequent spread of lettuce mosaic virus. Phytopath. 46:662–664.

Preparation and Application of Polyclonal Antibody on *Lettuce mosaic virus*

Li-Yu Tsao[1,*] and Jaw-Neng Lin[2]

Abstract

Tsao, L. Y. and J. N. Lin. 2015. Preparation and application of polyclonal antibody on *Lettuce mosaic virus*. J. Taiwan Agric. Res. 64(2):159–166.

Lettuce mosaic virus was isolated and identified from infected lettuce plants (*Lactuca sativa* var. *crisp*. L.) by using host reactions, electron microscopy, biological and serological assays in Taiwan. Upon artificial inoculation to 27 plant species belonging to 7 families, the virus infected lettuces (*Lactuca sativa* var. *asparagina, L. sativa* var. *capitata, L. sativa* var. *crispa*, and *L. scariola* var. *sativa*), spinach (*Spinacea oleracea*), pea (*Pisum sativum*) and tobacco (*Nicotiana benthamiana*) showed systemically mosaic symptoms. It developed systemically yellow lesions on *Chenopodium quinoa*, but only local necrotic lesions displayed on *C. amaranticolor* and *G. glodosa*. No other tested plants with symptoms were observed. The virus coat protein was purified by SDS-PAGE, from which the antiserum against LMV was produced. The titer of the antiserum against homogenous antigen in the crude sap was 5,000, tested by the indirect ELISA. The dilution end point of the crude sap detected by the antiserum was 1/640. Ten commercial lettuce seed lots were tested with the antiserum and the incidence of LMV was determined in range of 0–28%. Seven lots of lettuce seedlings collected from markets. Among them, 0–13.3% of the seedlings were positive to the LMV when detected by the antiserum. By testing 113 lettuce plants randomly collected from Mailiao Township of Yunlin County, the incidence percentage of LMV was 37%.

Key words: *Lactuca sativa* L., *Lettuce mosaic virus*, Antiserum, Detection.

Received: September 12, 2014; Accepted: December 27, 2014.
* Corresponding author, e-mail: tsly@fthes-tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
2 Assistant Research Fellow, Department of Vegetables, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chi-Chung
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chung-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Chen, Fure-Chyi
Department of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology

Chen, Suming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University

Chien, Li-Hsien
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Guo, Horng-Yuh
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Phathology, National Chung Hsing University

Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Huang, Pung-Ling
Department of Horticulture & Landscape Architecture, National Taiwan University

Kao, Ching-Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University

Ko, Wen-Hsiung
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Lu, Hsiu-Ying
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station

Ou, Shyi-Kuan
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Shen, Yuan
Department of Soil & Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Su, Jeng-De
Department of Food Science, Tunghai University

Tsay, Hsin-Sheng
Graduate Institute of Biochemical Sci. & Technol., Chaoyang University of Technology

Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute

Tseng, Menq-Jiau
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Wu, Hung-Pan
Institute of Plant & Microbial Biology, Academia Sinica

Editorial Assistants

Chen, Siang-Jiun
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Lee, Miao-Jyun
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Wu, Yi-Yan
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 64 No. 2 June 30, 2015

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Publisher	Junne-Jih Chen
Editor-in-Chief	Chwen-Ming Yang
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 41362, Taiwan, ROC
Website	http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	http://aspers.airiti.com/Aspers/webHome.aspx?jnliid=J0042
Press	Airiti Press Inc.
Address	18F., No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 23452, Taiwan, ROC
Tel	+886-2-2926-6006
E-mail	press@airiti.com
Price	NT$ 175 (per copy)
Distributor	1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 10485, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 40042, Taiwan, ROC Tel: +886-4-2226-0330